

de hageman factor

j.g.g.schoenmakers



DE HAGEMAN FACTOR

Isolatie en enzymatische eigenschappen
van bloedstollingsfactor XII

PROMOTOR: PROF. DR. F.W. ZILLIKEN

DE HAGEMAN FACTOR

**Isolatie en enzymatische eigenschappen
van bloedstollingsfactor XII**

ACADEMISCH PROEFSCHRIFT

**TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR
IN DE WISKUNDE EN NATUURWETENSCHAPPEN
AAN DE KATHOLIEKE UNIVERSITEIT TE NIJMEGEN,
OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS**

DR. S.J. GEERTS,

**HOOGLERAAR IN DE FACULTEITEN DER GENEESKUNDE
EN DER WISKUNDE EN NATUURWETENSCHAPPEN,
VOLGENS BESLUIT VAN DE SENAAT
IN HET OPENBAAR TE VERDEDIGEN
OP VRIJDAG 17 DECEMBER 1965
DES NAMIDDAGS TE 2 UUR**

DOOR

**JOHANNES GERARDUS GHISLAIN SCHOENMAKERS
GEBOREN TE WEERT**

1965

THOBEN OFFSET NIJMEGEN

..... Ik kan de benige blaas
vol begrip, boven mijn nek,
van slijmheid haast niet meer baas
hij maakt mij gek.
Nu vertelt hij mij helaas
hoe moleculen PTA
in water tot spiralen
worden zie je, maar in zout
op HF nederdalen en daarna
dit van het oppervlak halen
en zo, bedoel ik zelf, nou ja
dit is helemaal geen gedicht
maar het is allemaal lekker toch zo.
Ik heb eigenlijk helemaal geen trek
om een vers te schrijven;
het liefst zou ik, nog steeds gek,
thuis in een stoel blijven
zitten en zeggen och och
wat een slim ventje ben ik toch

Leo Vroman

"Merlijn", november 1963

Aan mijn ouders

Aan Marjolein

A F K O R T I N G E N

HF	Hageman factor
PTA	Plasma tromboplastine antecedent
DFP	Di-isopropylfluorofosfaat
SBTI	Trypsineremmer uit sojabonen
LBTI	Trypsineremmer uit limabonen
BAEE	N- α -benzoyl-L-arginine ethylester
TAME	p-Tosyl-L-arginine methylester
ATEE	N-acetyl-L-tyrosine ethylester
NANA	N-acetylneuraminezuur
EZ	Ellaginezuur
ACTH	Adrenocorticotroop hormoon
ϵ -ACA	Epsilon-aminocapronzuur

Dit proefschrift is tot stand gekomen door de stimulatie en in nauwe samenwerking met Dr. C. Haanen.

Voor de steun en interesse van Dr. C. Haanen, Dr. Ir. G. Vogels en Drs. J. Hafkenschied, alsmede voor de toegewijde hulp van Mej. R. Matze, bij mijn werk ondervonden, wil ik allen oprecht en hartelijk danken.

INHOUD

blz.

Voorwoord	11
---------------------	----

HOOFDSTUK I:

HUIDIG INZICHT IN HET STOLLINGSMECHANISME	13
1.1 Inleiding	13
1.2 De verschillende fasen in het stollingsproces	14
1.2.1 De fibrinevorming	14
1.2.2 De trombinevorming	15
1.2.3 De vorming van de protrombine activator	15
1.3 De stolling in vivo	19
1.4 Biochemische aspecten van de bloedstolling	20
1.5 Samenvatting	21

HOOFDSTUK II:

OVER DE HAGEMAN FACTOR	23
2.1 Oppervlakken en contactfase	23
2.2 Activering van de Hageman factor	24
2.3 Interactie van HF en PTA	26
2.4 Andere biologische functies van de Hageman factor	27
2.5 Problemen omtrent de contactfase	31

HOOFDSTUK III:

DE BEPALINGSMETHODEN VOOR DE HAGEMAN FACTOR ACTIVITEIT	35
3.1 Inleiding.	35
3.2 Bepaling van de Hageman factor activiteit met HF-deficiënt plasma	36
3.2.1 Principe	36
3.2.2 Uitvoering	37
3.2.3 Reproduceerbaarheid	38
3.2.4 Specificiteit	42
3.3 Bepaling van de Hageman factor activiteit met BAEE	42
3.3.1 Principe	42
3.3.2 Uitvoering	43
3.3.3 Specificiteit	44

HOOFDSTUK IV:

ISOLATIE VANDE HAGEMAN FACTOR UIT RUNDERPLASMA	45
4.1 Inleiding	45

4.2	Materialen	46
4.3	Isolatiemethode	47
4.3.1	Adsorptie aan Al(OH) ₃ -gel en glaspoederchromatografie	48
4.3.2	Fractionering met ethanol	51
4.3.3	Chromatografie over CM-Sephadex	53
4.3.4	Chromatografie over DEAE-Sephadex	58
4.4	Zuiverheid van de Hageman factor preparaten	61
4.5	De Hageman factor en de esterase activiteit	62
4.6	Conclusie en samenvatting	65

HOOFDSTUK V:

ENZYMATISCHE EIGENSCHAPPEN VAN DE HAGEMAN FACTOR		67
5.1	Inleiding	67
5.2	Actief centrum	67
5.3	Toegepaste meetmethoden	70
5.3.1	Spectrofotometrische methode	71
5.3.2	Titrimetrische methode	72
5.4	Invloed van de pH op de esterase activiteit	73
5.5	Invloed van substraat- en enzymconcentratie	73
5.6	Invloed van ionensterkte	77
5.7	Hydrolyse van andere substraten	78
5.8	Remmers	81
5.9	Reversibele enzyminactivering	87
5.10	Proteolytische eigenschappen van de Hageman factor	90
5.10.1	B-keten van insuline	91
5.10.2	ACTH	94
5.10.3	Chymotrypsinogeen A	97
5.11	Korte samenvatting en conclusie	101

HOOFDSTUK VI:

HAGEMAN FACTOR: EEN SIALOGLYCOPROTEINE		103
6.1	Inleiding	103
6.2	Structuur der oligosacchariden	104
6.3	Sialinezuur en glycoproteïnen	105
6.4	Materiaal en methoden	107
6.5	Verhouding tussen de verschillende koolhydraten	107
6.5.1	Neutrale suikers	107
6.5.2	Hexosamines	108
6.6	Kwantitatieve bepaling van de koolhydraten	109
6.6.1	Hexosen	109
6.6.2	Hexosamines	110
6.6.3	Sialinezuur	111
6.7	Hageman factor en neuraminidasen	113

6.8	Eigenschappen van sialinezuur-vrije Hageman factor	114
6.9	Samenvatting	115
HOOFDSTUK VII:		
	ENKELE FYSISCH-CHEMISCHE PARAMETERS	117
7.1	Sedimentatiemetingen	117
7.2	Diffusiemetingen	119
7.3	Molecuulgewicht verkregen door ioniserende bestraling	121
7.4	Molecuulgewicht verkregen door gelfiltratie	124
7.5	Discussie	126
7.6	Samenvatting	126
HOOFDSTUK VIII:		
	WAARNEMINGEN OVER HET WERKINGSMECHANISME VAN DE HAGEMAN FACTOR	129
8.1	Pseudoreversibiliteit van de Hageman factor activering	129
8.2	Hageman factor en fibrinolyse	132
8.3	Hageman factor en de bloedstolling	134
8.4	De interactie van HF en PTA	136
8.5	Conclusie en samenvatting	141
SAMENVATTING		143
SUMMARY		146
LITERATUUR		149

Een gedeelte van de in dit proefschrift vermelde resultaten is reeds elders gepubliceerd (referentie 98, 102, 119, 204, 207, 217).

VOORWOORD

Het verschijnsel dat bloed in enkele minuten stolt, wanneer het buiten de vaatwand treedt, wordt in het dagelijks leven als vanzelfsprekend beschouwd. Zo bekend echter als dit verschijnsel is, zo moeilijk is het geweest te ontdekken welke stoffen en mechanismen bij deze overgang een rol spelen. Het circulerende bloed bevat alle factoren welke voor het vormen van een stolsel noodzakelijk zijn, maar deze bevinden zich in een inactieve toestand, zodat een stimulus vereist is om het stollingsproces op gang te brengen.

Reeds in 1863 veronderstelde Lister¹ dat het in contact komen van bloed met een vreemd oppervlak een dergelijke stimulus zou zijn. Bordet en Gengou² en later Nolf³ constateerden dat bloed in contact met glas sneller stolt dan bloed in geparaffineerde omgeving, waarmee voor het eerst aan glasoppervlakken een versnellende werking op de bloedstolling werd toegeschreven. Het is begrijpelijk dat sindsdien veel gespeculeerd is over de eigenschappen van de stoffen welke, op analoge wijze als de vaatwand, in staat zijn bloed vloeibaar te houden; speculaties omtrent het accelerende effect van glasoppervlakken waren even talrijk. Aanvankelijk veronderstelden men dat de invloed van het glascontact bestond uit een effect op de bloedplaatjes. Dit laatste werd echter onwaarschijnlijk, toen Lozner en Taylor⁴ het stollingbevorderend effect ook konden waarnemen in plaatjes-vrij plasma. Daarom veronderstelden zij, evenals Nolf³ en Conley c.s.⁵, dat in normaal plasma een component in de inactieve vorm aanwezig zou zijn welke bij contact met glasoppervlakken geactiveerd wordt en op deze wijze de stolling versnelt. Deze gedachte kon daarna door vele onderzoekers, met name door Ratnoff en Conley⁶, Quick en Epstein⁷ en door Shafir en de Vries⁸ worden bevestigd.

Welke component in het menselijk plasma door glas geactiveerd wordt, kon in 1955 duidelijker worden omschreven. In dat jaar beschreven Ratnoff en Colopy^{9,10} namelijk een patiënt - John Hageman - wiens bloed een abnormaal lange stollingstijd vertoonde en bovendien de eigenschap miste door glasoppervlakken sneller tot stollen te worden gebracht. Het stollingsdefect kon echter worden opgeheven door toevoeging van uiterst geringe hoeveelheden normaal plasma, doch óók van plasma, deficient in andere tot dan toe bekende stollingsfactoren. De stof hiervoor verantwoordelijk wordt sindsdien de Hageman factor genoemd en het stollingsdefect omschreven als Hageman factor deficiëntie. Het bestaan van een dergelijke deficiëntie is daarna door een groot aantal onderzoekers aangetoond en reeds in 1962 waren ongeveer 60 patiënten bekend, meest van Duitse en Nederlandse afkomst, die ondubbelzinnig als Hageman factor deficiënt konden worden gekenmerkt¹¹.

Alhoewel de exacte manier waarop glasoppervlakken de activerende werking op de bloedstolling uitoefenen, tot op heden nog niet is vastgesteld, bestaat er echter geen twijfel meer over het feit dat glas zijn invloed doet gelden door een interactie met eventueel een activering van de Hageman factor.

In 1960 werd door Haanen c.s.^{12,13} een patiënte beschreven, woonachtig in Nijmegen, die eveneens als Hageman factor deficiënt kon worden gekarakteriseerd. Doordat wij op deze wijze konden beschikken over Hageman factor deficiënt plasma, waren wij in de gelegenheid een biochemisch onderzoek omtrent de Hageman factor te verrichten. De hierbij verkregen resultaten zijn in dit proefschrift beschreven.

HOOFDSTUK I

HUIDIG INZICHT IN HET STOLLINGSMECHANISME

„Some will say, as they always have said, that these factors, co-factors, activators and inhibitors are probably artefacts or mere figments of the imagination. All but one of the clotting factors have, by simple absence from the blood, produced specific haemorrhagic diatheses in man.”

R.G. Macfarlane

1.1 INLEIDING

Om de functie en de betekenis van de Hageman factor in het stollingsgebeuren nader te kunnen omschrijven, is een voorafgaande verduidelijking van de processen en mechanismen welke bij de bloedstolling een rol spelen, noodzakelijk. Lijkt een uitgebreide beschrijving van de waarnemingen nog wel mogelijk, de gedachte een volledig inzicht te kunnen verschaffen zou echter een onderschatting zijn van de complexiteit van het bloedstollingsproces. Het bloed bevat namelijk niet alleen de factoren welke het stollingsproces, wanneer dit nodig mocht zijn, op gang brengen en katalytisch versnellen, maar het bevat ook vele beveiligingsmechanismen welke ongewenste stolling kunnen voorkomen. Daarnaast is er een mechanisme aanwezig dat in staat is een eenmaal gevormd stolsel weer op te lossen. Onze kennis van de wijze waarop deze processen samenhangen en elkaar beïnvloeden, is nog fragmentarisch en vele vragen zijn nog onbeantwoord.

De grootste moeilijkheid bij het bestuderen van het bloedstollingsproces vormen ongetwijfeld de beperkte mogelijkheden van benadering. Het coaguleren van fibrine is het enige verschijnsel dat tijdens het stollingsproces kan worden waargenomen, zodat al onze kennis over de hieraan voorafgaande fasen uit de verschillen in de snelheid van fibrinevorming afgeleid moet worden. Dat desondanks het bestaan van 13 stollingsfactoren met zekerheid is vastgesteld, wekt grote bewondering. Gedurende de laatste jaren is langzaam een duidelijker beeld ontstaan over de wijze waarop het stollingsproces verloopt, een mechanisme, dat vooral van biochemisch standpunt gezien, belangwekkend is te noemen.

1.2 DE VERSCHILLENDE FASEN IN HET STOLLINGSPROCES

De in 1905 door Morawitz¹⁴ ontwikkelde theorie over het bloedstollingsgebeuren, waarbij protrombine door contact met weefsel wordt omgezet in trombine en dit laatste de omzetting van het fibrinogeen in fibrine bewerkstelligt, heeft meer dan 40 jaren in deze vorm standgehouden. Het enige bezwaar was dat deze theorie geen verklaring kon geven voor het stollingsdefect van de klassieke hemofilie, doch deze stoornis kwam slechts zelden voor. De eerste twijfel aan de geldigheid van deze theorie ontstond in 1947. In dat jaar ontdekte Owren¹⁵ een patiënt wiens protrombine niet door contact met weefsel in trombine kon worden omgezet. Door Owren werd daarom verondersteld, dat weefselcontact alleen niet voldoende was om protrombine om te zetten. Dat deze omzetting inderdaad niet zo eenvoudig is als in de klassieke theorie werd aangenomen, mag blijken uit de resultaten welke sinds de waarneming van Owren zijn verkregen en welke wij hier schematisch zullen bespreken.

Het bloedstollingsproces verloopt in drie fasen, welke wij willen aanduiden met:

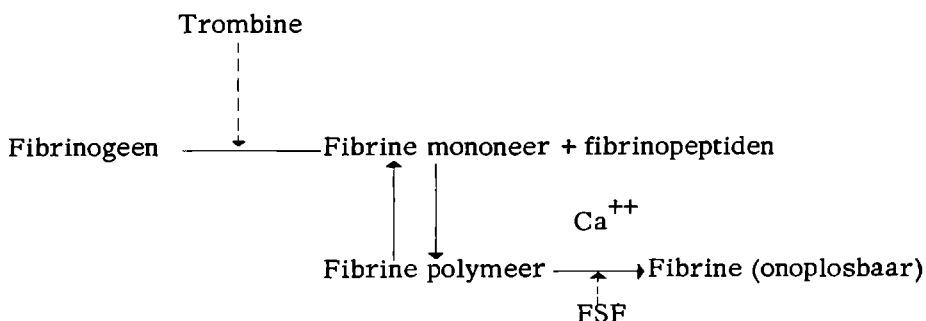
1. de fibrinevorming
2. de trombinevorming
3. de vorming van protrombine activator.

Om een overzichtelijk beeld te waarborgen zal een uitvoerige beschrijving van de waarnemingen welke de laatste 10-15 jaar zijn verkregen en welke tot het huidige inzicht hebben geleid, achterwege worden gelaten en zullen wij ons beperken tot een beknopte weergave van iedere fase afzonderlijk. Voor een uitgebreid overzicht van het stollingsproces zij verwezen naar de uitstekende overzichten welke door Biggs en Macfarlane¹⁶ evenals door Hougie¹⁷ zijn gegeven.

1.2.1 De fibrinevorming

De fibrinevorming onder invloed van trombine is zowel stollingsfysiologisch als biochemisch de meest bestudeerde reactie. Zij blijkt op haar beurt weer uit verschillende stappen te bestaan. Eerst splitst het proteolytisch enzym trombine op specifieke wijze vier arginylglycinebindingen in het fibrinogeen molecule, waardoor eenzelfde aantal sterk negatief geladen peptiden van het fibrinogeen verwijderd worden. Het fibrine monomeer dat hierbij ontstaat, polymeriseert spontaan tot het fibrine polymeer, dat vervolgens onder invloed van Ca^{++} -ionen en het enzym FSF (fibrine stabiliserende factor) gestabiliseerd wordt^{18,19}. Deze stabilisatie, waarbij tijdens een transamideringsreactie^{20,21} koolhydraten en NH_3 ²⁰ vrijkomen, heeft tot gevolg dat het stolsel niet meer oplosbaar is in 5 M ureum. De vorming van het fibrine is schematisch

weergegeven in figuur 1. Voor nadere bijzonderheden over het mechanisme van deze reacties zij verwezen naar de overzichten van Scheraga²² en Schoenmakers²³.



Figuur 1: Schema van de vorming van gestabiliseerd fibrine ("stolsel")

1.2.2 De trombinevorming

Omdat de aanwezigheid van trombine in het circulerende bloed direct zou leiden tot fibrinevorming, werd reeds door Morawitz¹⁴ gepostuleerd dat een inactief pro-enzym - protrombine - in het bloed aanwezig zou zijn. De "activering" van protrombine tot trombine zou enzymatisch geschieden en wel door het z.g. "trombokinase", uit weefsel afkomstig. Tegenwoordig weten wij dat de omzetting van protrombine in trombine langs biologische weg op twee verschillende manieren tot stand kan komen en wel in beide gevallen door een complex van stollingsfactoren die wij zullen aangeven met achtereenvolgens de intrinsieke en extrinsieke protrombine activator. In beide gevallen is bij de omzetting van protrombine de aanwezigheid van Ca^{++} -ionen noodzakelijk.

Door het Internationale Comité voor de nomenclatuur van bloedstollingsfactoren is aan iedere factor als rangnummer een Romeins cijfer gegeven dat in tabel 1 samen met de meest gebruikelijke naam aangegeven is. In dit proefschrift zal alleen deze nomenclatuur worden gebruikt, waarbij bovendien iedere geactiveerde stollingsfactor zal worden voorzien van het toevoegsel "a" achter het desbetreffende rangnummer.

1.2.3 De vorming van de protrombine activator

Het op gang komen van het stollingsproces, waarbij een protrombine activator wordt gevormd, kan op twee verschillende wijzen geschieden.

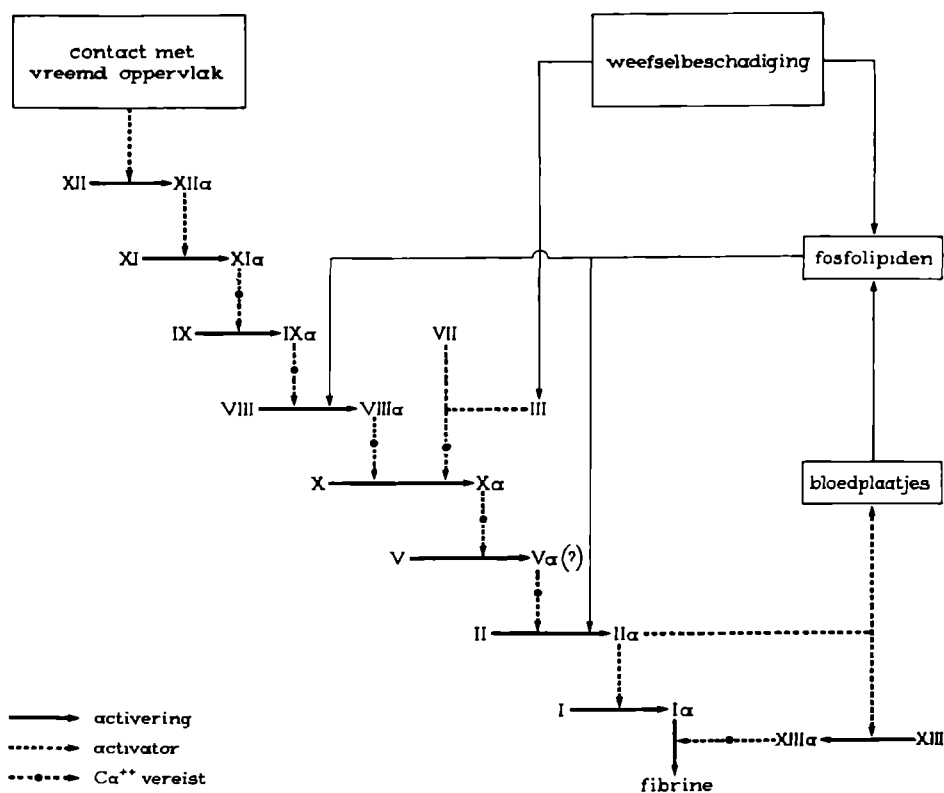
T A B E L I
Nomenclatuur van de bloedstollingsfactoren

Factor	Naam
I	fibrinogeen
II	protrombine, trombine is II a *
III	tromboplastine
IV	Ca ⁺⁺ -ionen in fysiologische concentratie
V	proaccelerine
VI	accelerine, identiek aan V a *
VII	proconvertine
VIII	antihemofilie factor A
IX	Christmas factor
X	Stuart-Prower factor
XI	PTA, plasma tromboplastine antecedent
XII	HF, Hageman factor
XIII	FSF, fibrine-stabiliserende factor

*) Met het suffix "a" wordt de geactiveerde vorm van de betreffende stollingsfactor aangegeven.

De eerste wijze van stolling vindt plaats door inwerking van een weefselfactor die vrijkomt uit de beschadigde cel. Dit enzym, dat chemisch het karakter heeft van een lipoproteïne²⁴, is samen met de factoren VII, X, V en Ca⁺⁺-ionen verantwoordelijk voor de vorming van een actief principe dat in staat is het protrombine in trombine om te zetten. Omdat deze wijze van stolling op gang gebracht wordt door een enzym uit de weefsels, wordt dit proces de extrinsieke stolling genoemd. In figuur 2 zijn de reacties die bij het extrinsieke stollingsproces betrokken zijn, schematisch weergegeven. Twee reacties zijn nog niet met zekerheid vastgesteld. De eerste betreft factor VII. Door de onderzoeken van Nemerson en Spaet²⁴ is komen vast te staan, dat extracten van hersenen een eiwit ("factor III") bevatten dat factor X activeert in aanwezigheid van factor VII, maar of het genoemde eiwit dan wel factor VII (of allebei) een chemische verandering ondergaan, is onbekend en wordt dan ook niet in het schema aangegeven. De tweede onzekerheid betreft het bestaan van Va waaraan door Papahadjopoulos c.s.^{25,26} en Breckenridge en

Ratnoff²⁷ op grond van experimentele gegevens niet getwijfeld wordt. Daarentegen komen Esnouf en Jobin²⁸ tot een tegenovergestelde conclusie. Het actief principe dat voor de omzetting van protrombine verantwoordelijk is, wordt gevormd door Xa^{29-32} , maar alleen in aanwezigheid van factor V, fosfolipiden en Ca^{++} -ionen. Of inderdaad Va als intermediair hierbij optreedt, zal nog moeten worden afgewacht.



Figuur 2: Bloedstollingsschema, weergegeven als een trapsgewijze activering van de stollingsfactoren

De tweede wijze van stolling wordt op gang gebracht zonder dat een actieve substantie van buiten af hierbij noodzakelijk is. Zij komt tot stand door de componenten van het bloed zelf; het enige vereiste is dat het bloed (of plasma) in contact treedt met een vreemd oppervlak. Men noemt deze wijze van stolling de intrinsieke stolling. De stollingsfactoren die gezamenlijk verantwoordelijk zijn voor de vorming van de intrinsieke protrombine activator zijn:

- | | |
|----------------------------|--------------------------|
| 1. factor V | (proaccelerine) |
| 2. factor VIII | (antihemofilie factor A) |
| 3. factor IX | (Christmas factor) |
| 4. factor X | (Stuart-Prower factor) |
| 5. factor XI | (PTA) |
| 6. factor XII | (Hageman factor) |
| 7. bloedplaatjes | |
| 8. Ca^{++} -ionen | |

Dit proces van intrinsieke stolling komt - althans in vitro - op gang door contact met een vreemd oppervlak zoals glas. Plasma dat zich in geparaffineerde, gesiliconeerde of plastic buizen bevindt, blijft vloeibaar gedurende 24-48 uur of zelfs langer. Wordt dit plasma echter overgebracht in een glazen buis - dan treedt stolling op en wel in enkele minuten. Ratnoff c.s.³³⁻³⁵, Margolis^{36,37} en vele anderen³⁸⁻⁴⁰ hebben waargenomen dat glasoppervlakken het intrinsieke stollingsproces op gang brengen door activering van de Hageman factor, een proces, dat eveneens door een aantal andere vaste stoffen kan worden teweeggebracht.

De geactiveerde Hageman factor is in staat het PTA te activeren^{34,36,40,41}, waardoor een reeks van trapsgewijze reacties op gang komt die uiteindelijk leiden tot de vorming van fibrine. Het verloop van dit proces is schematisch weergegeven in figuur 2. De reacties die de Hageman factor en het PTA in aanwezigheid van glasoppervlakken ondergaan, worden algemeen aangeduid als de "contactfase" van de stolling en vormen één van de onderwerpen die in dit proefschrift beschreven zullen worden. Het reactieproduct, dat tijdens deze contactfase ontstaat, wordt veelal het "contactprodukt" genoemd en is zeer waarschijnlijk dezelfde actieve vorm die door Waaler³⁸ activatieproduct en door Ratnoff c.s.³⁴ het geactiveerde PTA wordt genoemd. In dit proefschrift zullen de termen contactprodukt en geactiveerde PTA (XIa) gebruikt worden.

Het inzicht in het verdere verloop van het intrinsieke stollingsproces is vooral de laatste 2 jaren zeer sterk toegenomen. Hierbij is duidelijk naar voren gekomen dat van iedere stollingsfactor een inactieve vorm bestaat en dat iedere geactiveerde stollingsfactor een zeer specifiek bij zijn werking passende, volgende factor kan activeren. Zo is o.a. vastgesteld dat het actieve PTA langs enzymatische weg in staat is factor IX te activeren^{38,42,43}, een proces dat de aanwezigheid van Ca^{++} -ionen vereist. De reactie kan geremd worden door heparine⁴⁴.

De interactie van de factoren IX, VIII en X is eveneens door vele researchgroepen onderzocht. Door Lundblad en Davie⁴⁵ is recent aangetoond dat IXa, eveneens langs enzymatische weg, factor VIII kan activeren. Bij deze reactie zijn behalve Ca^{++} -ionen ook fosfolipiden noodzakelijk. Het hierbij gevormde VIIIa kan factor X omzetten in zijn geactiveerde vorm^{46,47} wanneer Ca^{++} -ionen aanwezig zijn. De overige reacties - leidende tot fibrine - zijn identiek aan die, welke reeds bij de

extrinsieke stolling uiteengezet zijn. Uitdrukkelijk moet hier gesteld worden dat het huidige inzicht grotendeels gebaseerd is op laboratoriumproeven, uitgevoerd met stopwatch, bloedmonsters en een grote dosis vernuft; de gedachte dat het bloedstollingsgebeuren in vivo door dit schema volledig zou worden gedekt, is te simplistisch.

1.3 DE STOLLING IN VIVO

Over het bloedstollingsproces in vivo dienen nog enkele opmerkingen gemaakt te worden, met name over de activering van de Hageman factor. Het mechanisme van de activering langs fysiologische weg is onbekend, maar het vermogen van enkele niet-fysiologische oppervlakken om dit mechanisme na te bootsen doet alleen veronderstellen dat een veranderde vaatwand voor de activering van de Hageman factor verantwoordelijk zou kunnen zijn.

Als tweede punt zij nog opgemerkt dat voor de werking van proaccelerine (V) en voor de activering van de antihemofilie factor (VIII) de aanwezigheid van fosfolipiden noodzakelijk is. Wordt in vitro hieraan voldaan door een "cefalinesuspensie" toe te voegen, in vivo komen deze stoffen vrij door het bloedstollingsgebeuren zelf. Bij de extrinsieke stolling is het lipoid aanwezig in het weefsel tromboplastine, bij de intrinsieke stolling wordt dit geleverd door de trombocyten, waaruit het vrijkomt wanneer deze uiteenvallen en samenklonteren (visceuze metamorfose).

Behalve het leveren van het onmisbare lipoid oefenen de trombocyten nog enkele andere, bijzonder belangrijke functies uit bij het stollingsproces in vivo. Aan de trombocyten zijn nl. enkele stollingsfactoren geadsorbeerd, die vrijkomen bij het uiteenvallen van de bloedplaatjes. Door deze hogere concentratie van stollingsfactoren in de directe omgeving van de geaggregeerde bloedplaatjes vindt de stolling in het bloed dat tussen deze geaggregeerde plaatjes gevangen is, sneller plaats dan in de rest van het stromende bloed en draagt op deze wijze bij aan het proces van de bloedstelping.

Deze vrijwaring van verbloeding is de tweede functie van de trombocyten. Zodra een bloedvat of capillair beschadigd wordt, kleven de trombocyten aan de beschadigde vaatwand⁵⁰. Deze aanvankelijk reversibele aggregatie, waarbij behalve ADP tevens de z.g. anti-Willebrand factor⁴⁸ (ontbrekend bij de ziekte van Von Willebrand-Jürgens) en Ca^{++} -ionen zijn betrokken, gaat over in een irreversibele aggregatie en uiteindelijk samenvloeiing van de trombocyten (visceuze metamorfose) onder invloed van sporen trombine⁴⁹. Deze "trombocyten-plug", door fibrine en erythrocyten uiteindelijk samengekit tot een definitieve afsluiting, is onverbrekkelijk verbonden met de vorming van trombine en zo met het totale bloedstollingsproces.

1.4 BIOCHEMISCHE ASPECTEN VAN DE BLOEDSTOLLING

Zoals reeds onder 1.2 werd vermeld, blijkt iedere stollingsfactor in een inactieve en een actieve vorm te kunnen voorkomen. Bij vele activeringsprocessen werd bovendien gewezen op het enzymatisch verloop van deze reactie, zonder dat een nadere toelichting werd gegeven. Indien echter iedere geactiveerde stollingsfactor een enzymatische activiteit bezit, dan duidt het activeringsproces van enzymologisch standpunt uit bezien op een reactie, waarbij het enzym een zeer specifiek bij zijn werking passend substraat omzet tot een produkt dat op zijn beurt weer enzymatische activiteit bezit. Het stollingsproces zelf kan zo beschouwd worden als een reeks van eiwit-eiwitinteracties waarbij door de werking van het eerste enzym een tweede ontstaat dat op zijn beurt weer aanleiding geeft tot het ontstaan van een derde enzym, enz. Een dergelijk stapsgewijs verlopend proces is recent door Davie en Ratnoff⁵¹ als een "waterfall sequence" en door Macfarlane⁵² als een "enzym cascade" gekarakteriseerd. De vraag welk type van enzymatische reacties hieraan ten grondslag ligt, is niet met zekerheid te beantwoorden, maar dat proteolyse een overheersende rol vervult bij het bloedstollingsproces, lijdt geen twijfel. Enkele recente waarnemingen mogen deze gedachte verduidelijken. De omzetting van het fibrinogeen in fibrine (Ia) door het enzym trombine is duidelijk als een proteolytische reactie gekarakteriseerd²². Door Sherry en Troll⁵³ is aangetoond dat het trombine - analoog aan vele proteolytische enzymen - esterase eigenschappen bezit; esters als BAEE en TAME zijn substraten die door trombine worden gehydrolyseerd. Esnouf en Williams²⁹ toonden aan dat de geïsoleerde factor X door incubatie met het RVV (Russell's viper venom) kon worden omgezet in Xa. Het RVV, dat enzymatisch voor deze omzetting verantwoordelijk is, werd als een TAME esterase gekenmerkt. Dat het ontstane produkt Xa, in tegenstelling tot factor X, eveneens esterase eigenschappen tegenover TAME bezit, past geheel in het beeld van de enzym cascade. Dat hier duidelijk van een activering langs proteolytische weg sprake is, is o.a. door sedimentatie- en diffusiemetingen bevestigd²⁹.

Door Milstone c.s.⁵⁴ is een proteolytisch enzym uit plasma geïsoleerd dat verantwoordelijk is voor de omzetting van protrombine in trombine. Dit enzym - door Milstone "trombokinas" genoemd - bezit behalve een hoge TAME esterase activiteit tevens het vermogen om chymotrypsinoogeen A in chymotrypsine om te zetten⁵⁵. Het trombokinas bleek identiek te zijn aan het door Esnouf geïsoleerde Xa, evenals het autoprotrombine C van Seegers⁵⁶ en het produkt I van Bergsagel en Hougie⁵⁷. Alle genoemde produkten zijn in staat zuiver protrombine in trombine om te zetten, een reactie die bovendien kon worden versneld door toevoeging van Ca^{++} -ionen, factor V en fosfolipiden. Opmerkelijk is dat de vier, langs verschillende wegen geïsoleerde preparaten geremd kunnen worden door de trypsine inhibitor uit sojabonen, maar niet door diiso-

propylfluorofosfaat (DFP).

Het feit dat factor X langs proteolytische weg kan worden geactiveerd door het slangegif RVV, doet vermoeden dat een soortgelijk activeringsmechanisme in het stollingsproces aanwezig is. Hoewel een enzymatische activering van factor X door VIIIa vastgesteld kon worden, bleek deze reactie niet te worden geremd door DFP. Evenmin kon een remming door DFP worden waargenomen bij de activering van factor VIII door IXa⁴⁵. Bij deze laatste reactie had SBTI géén, maar heparine en het metaalion Th^{4+} wél een remmend effect⁴⁵. Bij deze twee reacties moet echter worden opgemerkt dat een waargenomen remming door SBTI of DFP de aanwezigheid van een protease of esterase waarschijnlijk maakt, maar dat het omgekeerde zeker niet geconcludeerd mag worden.

De enzymatische activering van factor IX door het PTA (XIa) is een reactie die behalve door heparine⁴³ eveneens door DFP geremd wordt⁴⁴. Door Kingdon c.s.⁴⁴ is bovendien aangetoond dat het geactiveerde PTA een esterase activiteit bezit tegenover de esters TAME en BAEE, welke door de proteaseremmer DFP geremd kan worden,

Tot slot zij nog vermeld dat Papahadjopoulos c.s.²⁶ een verschil in molecuulgewicht hebben waargenomen tussen proaccelerine (V) vóór en na incubatie met trombine.

Omdat de reeks van enzymatische reacties welke het intrinsieke stollingsproces kenmerken, op gang wordt gebracht door de Hageman factor in de geactiveerde vorm, is het logisch te veronderstellen, dat deze initiator een enzym zal zijn. Wanneer bovendien gepostuleerd wordt dat het bloedstollingsproces een tragsgewijze vorm van proteolyse is, kan als werkhypothese gelden dat de Hageman factor een proteolytisch enzym zal zijn.

1.5 SAMENVATTING

Samenvattend mag het volgende worden gesteld:

1. Iedere stollingsfactor met een eiwitkarakter kan in plasma voorkomen in een inactieve en een actieve vorm.
2. Wanneer de stolling op gang komt, wordt iedere stollingsfactor op specifieke wijze omgezet in een actieve vorm die - met uitzondering van fibrine - een enzymatische activiteit bezit.
3. De activering is in zoverre specifiek, dat deze enzymatisch tot stand komt door het substraat om te zetten tot een enzym dat op zijn beurt slechts een volgende stollingsfactor kan activeren.
4. Vele activeringsreacties zijn proteolytische reacties. Duidelijk is dit vastgesteld voor de omzetting van fibrinogeen (I), protrombine (II),

Stuart-Prower factor (X) en gedeeltelijk geldt dit voor Christmas factor (IX).

5. Alle activeringsreacties, met uitzondering van de activering van PTA door HF en van fibrinogeen door trombine, vereisen de aanwezigheid van Ca^{++} -ionen (IV).

HOOFDSTUK II

OVER DE HAGEMAN FACTOR

„Life is the art of drawing sufficient conclusions from insufficient premises.”

S. Butler

Wanneer bloed in contact treedt met een "vreemd" oppervlak, wordt het intrinsieke stollingsproces op gang gebracht. Zoals reeds in hoofdstuk I is uiteengezet, zijn de Hageman factor en het PTA hier ten nauwste bij betrokken, waarbij algemeen aanvaard wordt dat de Hageman factor door het oppervlak wordt geactiveerd en in deze toestand in staat is het PTA te activeren.

Omdat een belangrijk deel van ons onderzoek gericht geweest is op het activeringsmechanisme van de Hageman factor en de reactie van de laatste met het PTA, is een nadere beschrijving van deze contactfase noodzakelijk. Tot slot volgt een korte uiteenzetting van het experimentele gedeelte van dit proefschrift.

2.1 OPPERVLAKKEN EN CONTACTFASE

Nadat de invloed van het oppervlak op de activering van de intrinsieke stolling bekend was geworden, zijn er vele pogingen verricht om de fysische en chemische eigenschappen van het oppervlak, die verantwoordelijk zijn voor dit stollingactiverend vermogen, te analyseren. Ondanks vele onderzoeken is dit probleem tot nu toe nog steeds niet opgehelderd.

Zo veronderstelde Lampert⁵⁸ dat het versnellen van de stolling samenhangt met het hydrofiele karakter van het oppervlak, maar Hirschboeck⁵⁹ constateerde geen versnellend effect van collodion, een stof, waarvan het oppervlak evenals van glas uitstekend bevochtigd kan worden. Aan de elektrische lading van het oppervlak is eveneens een belangrijke invloed toegekend. Hubbard en Lucas⁶⁰ stelden het ladingteken van het oppervlak verantwoordelijk voor het versnellen van de stolling en wel zodanig, dat een neutrale of zwak positieve lading geen effect, een negatieve lading van het oppervlak daarentegen wel een versnellend effect op de stolling uitoefent. Beide auteurs zien het versnellende effect uitsluitend als een gevolg van de hogere concentratie van Ca^{++} -ionen aan het grensvlak

glas-citraatplasma. Deze interpretatie is echter onjuist, omdat door vele auteurs vastgesteld is, dat glasoppervlakken hun versnellende invloed op de stolling doen gelden door activering van de Hageman factor ^{33,38-40,61-63} ook in afwezigheid van Ca^{++} -ionen. Margolis⁶⁴ constateerde een activering van de Hageman factor door $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ deeltjes als hun netto oppervlaktelading negatief is; de activerende eigenschap van de deeltjes ging verloren, als de nettolading in positief werd veranderd. In het algemeen bleken slechts die oppervlakken in staat de Hageman factor te activeren welke een negatieve oppervlaktelading bezitten⁶⁴. Waaler³⁸ constateerde een geringe activering van de Hageman factor door met zuur behandelde glasoppervlakken. Werd het glas daarna met alkali behandeld, dan bleek de activerende werking veel groter te zijn. Dit laatste wijst eveneens op de betekenis van de nettolading van het oppervlak, daar met alkali voorbehandeld glas een grotere zëtapotentiaal bezit. De waarneming van Haanen c.s.⁶⁵ dat voorbehandeling van glas met het basische eiwit protamine de stollingsactiverende invloed van glas vermindert, kan in dezelfde zin verklaard worden. Immers adsorptie van protamine aan de glaswand zal de negatieve lading ervan vrijwel geheel opheffen.

Behalve de lading van het oppervlak zijn echter nog andere factoren van invloed. Zo blijkt bijvoorbeeld de activerende invloed van colloïdaal kiezelzuur behalve van de lading ook afhankelijk te zijn van de deeltjesgrootte⁶⁶.

De volgende oppervlakken zijn als inert te beschouwen: vaatendotheel, plastic, cellofaan en edele metalen, evenals oppervlakken bedekt met paraffine, silicone en dimethyldichloorsilaan. Margolis toonde aan dat $\text{Al}(\text{OH})_3$ en BaSO_4 eveneens tot de inerte stoffen gerekend kunnen worden.

Tot de activerende oppervlakken - oppervlakken, die de Hageman factor activeren - behoren glas^{33,38-40,61-63} kaoline³³, noritpoeder³³, bariumcarbonaat³³, super-cel³³, asbest³⁹, kiezelzuur⁶⁸, bentoniet⁶⁷, carboxymethylcellulose³⁴, kristallen van natriumuraat, hypoxantine en calciumpyrofosfaat⁶⁹ evenals de micellen van $\text{C}_{10}\text{-C}_{22}$ verzadigde vetzuren⁷⁰⁻⁷³. Deze reeks kan worden uitgebreid met enkele andere materialen, die door Hubbard en Lucas⁶⁰ en door Margolis³⁷ zijn aangegeven.

De intrigerende vraag welke de (gemeenschappelijke) eigenschap van deze oppervlakken is, die verantwoordelijk is voor de activering van de Hageman factor, blijft onbeantwoord.

2.2 ACTIVERING VAN DE HAGEMAN FACTOR

De veranderingen die een Hageman factor molecule ondergaat, wanneer het onder invloed van een oppervlak geactiveerd wordt, zijn eveneens nog onbekend. Belangrijk is echter de waarneming, dat vele

oppervlakken die in staat zijn de stolling op gang te brengen, eveneens de Hageman factor adsorberen. Omdat de geadsorbeerde Hageman factor in staat is de verlengde stollingstijd van HF-deficiënt plasma te corrigeren, postuleerden Hardisty en Margolis⁴¹ dat de Hageman factor slechts dan in de actieve toestand verkeert wanneer deze aan een oppervlak geadsorbeerd is. Adsorptie alleen blijkt echter niet voldoende om de activering te verklaren. Schiffman c.s.⁷⁴ constateerden namelijk een adsorptie van de Hageman factor aan DEAE-cellulose welke echter niet gepaard ging met een activering van de Hageman factor. Door Ratnoff c.s.³⁴ werd een correctie van de stollingstijd waargenomen, wanneer een gezuiverd Hageman factor preparaat geïncubeerd werd met HF-deficiënt plasma in gesiliconeerde buizen. Hieruit concludeerde Ratnoff dat de geïsoleerde Hageman factor zich in de actieve toestand bevond terwijl geen activerend oppervlak aanwezig was. Welke verandering aan het molecuul bij deze overgang in de actieve toestand heeft plaats gevonden, is onbekend, maar dat glas en andere negatieve oppervlakken hiervoor verantwoordelijk zijn, wordt niet betwijfeld³³⁻³⁵. Door Margolis³⁷ is gepostuleerd dat het activeringsmechanisme bestaat uit een verandering in de configuratie van het eiwitmolecuul bij adsorptie aan een negatief oppervlak. Deze verandering zou dan een openleggen van een actief centrum tot gevolg hebben, waardoor de Hageman factor enzymatisch actief wordt. Dit openleggen - en dus activeren - is volgens Margolis afhankelijk van de afmetingen van het betreffende oppervlak; colloïdale silicaatdeeltjes kunnen de Hageman factor niet meer activeren als hun afmetingen kleiner zijn dan het Hageman factor molecuul⁶⁶.

Voor de overgang van de inactieve naar de actieve toestand is een negatief oppervlak niet per se noodzakelijk. Ratnoff en Crum⁷⁵ toonden een activering aan door kleine hoeveelheden ellaginezuur (4,4', 5,5', 6,6', hexahydroxydifeenzuur 2,6:2',6' dilacton) en enkele analoge verbindingen. Bovendien zijn door Webster en Ratnoff⁷⁶ evenals door Margolis³⁷ resultaten verkregen die duiden op een activering van de Hageman factor door aceton en chloroform.

Vroman^{77,78} heeft door ellipsometrie de veranderingen in laagdikte bestudeerd tijdens de adsorptie van enkele stollingsfactoren aan hydrofiele en hydrofobe oppervlakken. Op grond van de verkregen resultaten houdt Vroman het volgende activeringsmechanisme voor mogelijk: bij de adsorptie van de Hageman factor aan een polair oppervlak vindt een zodanige verandering in de configuratie plaats dat de polaire groepen van het eiwitmolecuul zich naar het oppervlak toe richten. Het inwendige, meer hydrofobe gedeelte van het eiwitmolecuul wordt hierdoor meer aan het vloeistofmedium blootgesteld. Het ontsluiten van dit meer apolaire gebied zou niet alleen essentieel kunnen zijn voor het bezitten van enzymatische activiteit, maar bovendien de interactie met het PTA mogelijk maken, waarvan het meer apolaire karakter aangetoond is⁶².

Uit deze onderzoeken blijkt dat het activeringsmechanisme van de

Hageman factor op moleculair niveau, ondanks de reeds bereikte resultaten, nog niet is opgelost. Om dit te bereiken zou men moeten beschikken over de geïsoleerde Hageman factor in de inactieve toestand, zodat de moleculaire veranderingen die deze bij activering ondergaat, bestudeerd kunnen worden. Pogingen om de inactieve Hageman factor te isoleren hebben echter tot nu toe slechts het actieve produkt opgeleverd³⁴. Dat dit tot andere interpretaties van het activeringsmechanisme aanleiding kan geven, wordt uiteengezet onder 2.5 van dit hoofdstuk.

2.3 INTERACTIE VAN HF EN PTA

De volgende reactie die zich afspeelt tijdens de contactfase, is de interactie van de geactiveerde Hageman factor en het PTA. Hierbij wordt algemeen aanvaard dat de geactiveerde Hageman factor enzymatisch het PTA kan activeren tot een produkt dat aangeduid wordt als "contactprodukt"^{34,38,40,61}. Voor deze reactie zijn Ca^{++} -ionen niet noodzakelijk³⁸. De contactfase kan zo schematisch in twee reacties worden weergegeven:

Activerend oppervlak + Hageman factor \rightarrow geactiveerde Hageman factor (a)

Geactiveerde Hageman factor + PTA \rightarrow contactprodukt (b)

Het contactprodukt is verantwoordelijk voor de activering van factor IX, maar deze reactie kan alleen verlopen in aanwezigheid van Ca^{++} -ionen. Wordt derhalve citraatplasma in contact gebracht met een activerend oppervlak, dan kunnen reactie (a) en (b) normaal verlopen, maar het eindprodukt van deze twee reacties is slechts werkzaam indien Ca^{++} -ionen aan het citraatplasma toegevoegd worden.

De vraag rijst: wat is het contactprodukt?

Door vele onderzoekers^{33,38,79} is geconstateerd dat het contactprodukt bij behandeling van normaal plasma met celite voor een groot gedeelte aan het celite is geadsorbeerd. Het contactprodukt kan van dit adsorbens worden geëluëerd^{38,41} en het zo verkregen eluaat is in staat de stollings-tijd van normaal plasma dat niet in contact is geweest met een activerend oppervlak - z.g. intact plasma - sterk te verkorten. Indien een celite-eluaat bereid wordt van HF-deficiënt of van PTA-deficiënt plasma, dan wordt geen contactprodukt verkregen, hetgeen in overeenstemming is met reactie (a) en (b). Hieruit blijkt echter alleen dat HF en PTA verantwoordelijk zijn voor de vorming van het contactprodukt; de volgorde van de reacties is hiermee niet bepaald. Op grond van stollings-experimenten veronderstelden Vroman⁶² en Waaler³⁸ dat glas zowel het PTA als de Hageman factor zou activeren. Biggs c.s.⁶¹, Hardisty en Margolis⁴¹ en Soulier c.s.^{40,67} toonden daarentegen aan dat de Hageman factor eerst geactiveerd zou worden door het oppervlak en daarna met

het PTA zou reageren. Deze bevindingen konden later door Ratnoff c.s.³⁴ en Nossel⁷³ bevestigd worden. Ratnoff c.s.³⁴ slaagden er namelijk in zowel de Hageman factor als het PTA in gedeeltelijk zuivere vorm te brengen. Werden beide geïncubeerd in een gesiliconeerde buis, dan bleek een reactieproduct met grote stollingsactiviteit te ontstaan. Bovendien bleek de vormingssnelheid een functie te zijn van de toegevoegde hoeveelheid Hageman factor, terwijl de ontwikkelde stollingsactiviteit een functie was van de hoeveelheid PTA. Ratnoff concludeerde hieruit dat de geactiveerde Hageman factor het PTA als substraat gebruikt en dit enzymatisch omzet tot een product, het actieve PTA. De volgorde van de reacties die plaatsvinden bij contact van plasma met een activerend oppervlak, zijn met Ratnoff's experimenten vastgelegd en worden sindsdien aanvaard.

Hoewel de actieve Hageman factor als enzym in de stolling werkzaam is, is het enzymatische karakter van deze factor nog geenszins duidelijk. Wel toonde Becker⁸⁰ aan dat glaspoedereluat een stollingsactiviteit bezitten die door DFP te remmen is. Becker nam op grond van de verkregen stollingsproeven aan dat de Hageman factor geremd wordt en postuleerde dat deze factor een esterase zou zijn. Door Ratnoff c.s.³⁴ werd eveneens een DFP remming geconstateerd aan onzuivere Hageman factor preparaten, maar hij was niet in staat dit aan meer gezuiverde preparaten te bevestigen³⁵. Kort geleden werd echter weer door Ratnoff en Miles⁸¹ een remming van de actieve Hageman factor geconstateerd bij 5×10^{-2} M DFP. Niewiarowski c.s.⁸² vonden een esterase activiteit voor TAME in kaoline eluaten van normaal plasma; eluaten bereid van HF-deficiënt plasma vertoonden een veel lagere esterase activiteit en zij veronderstelden daarom dat de activiteit aan de Hageman factor zou toebehoren.

Niewiarowski⁸² constateerde een remming van deze esterase activiteit door de trypsineremmer uit pancreas en sojabonen. Hoewel het geenszins is bewezen, is de mogelijkheid dat de Hageman factor een proteolytisch enzym is met esterase eigenschappen, toch zeer waarschijnlijk. Met name doen de andere biologische functies die aan de Hageman factor toegeschreven worden, dit sterk vermoeden.

2.4 ANDERE BIOLOGISCHE FUNCTIES VAN DE HAGEMAN FACTOR

Door de onderzoeken van vele werkgroepen is langzamerhand het inzicht ontstaan dat nog tenminste drie andere biologische functies aan de Hageman factor toegeschreven moeten worden. Deze zijn de vorming van een bradykinine-achtige activiteit in plasma, de vorming van een product, dat de vasculaire permeabiliteit doet toenemen en het op gang brengen van het proces van de fibrinolyse.

In dit proefschrift worden alleen de resultaten besproken die verkregen

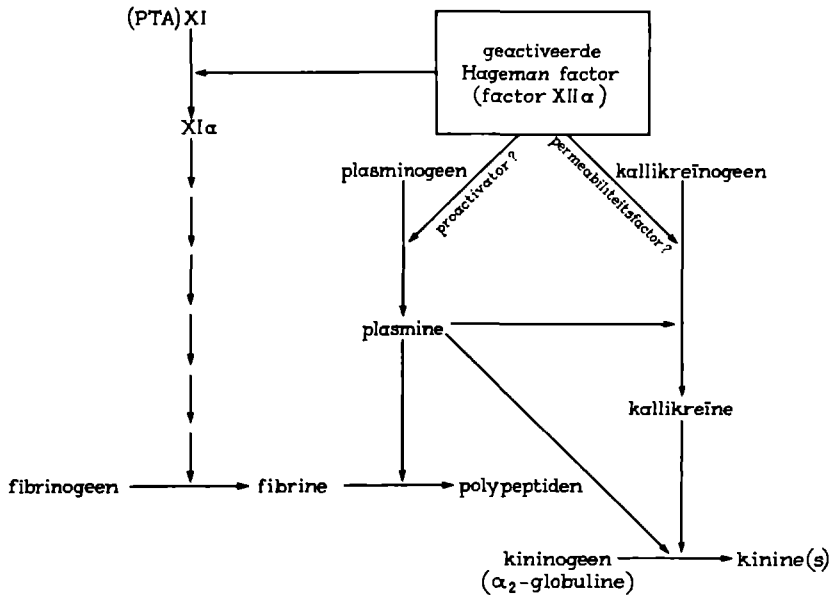
zijn bij de bestudering van de bloedstolling en de fibrinolyse; de andere functies van de Hageman factor zijn niet nader bestudeerd en zullen hier slechts beknopt weergegeven worden. Voor nadere bijzonderheden over de betekenis van de Hageman factor bij deze processen wordt verwezen naar de artikelen van o.a. Margolis³⁷ en Eisen⁸³.

De plasmakinines, zoals bradykinine, kallidine, methionyllysylbradykinine en mogelijk enkele andere, zijn kleine polypeptiden, die de eigenschap bezitten bepaalde gladde spieren tot contractie te brengen, de capillaire permeabiliteit te vergroten en vasodilatatie te veroorzaken. Deze farmacologische activiteiten ontstaan uit een α_2 -globuline in plasma - het kininogeen - door inwerking van één van de enzymen trypsine, plasmine of het door Kraut c.s.⁸⁴ ontdekte enzym kallikreïne. Het kallikreïne, dat in het plasma als een inactieve precursor - kallikreinogeen - circuleert, is behalve uit plasma eveneens uit andere lichaamsvloeistoffen en weefsels geïsoleerd, zoals urine, pancreas en speekselklieren^{85,86}. Alle genoemde kinine-vormende enzymen hebben de eigenschap gemeen de arginine esters BAEE en TAME te hydrolyseren. In overeenstemming hiermee bezitten de kinines arginine als C-eindstandig aminozuur.

Door Armstrong c.s.⁸⁷ werd waargenomen dat plasma na contact met glas of andere activerende oppervlakken een kinine activiteit vertoonde. Deze activiteit werd echter niet waargenomen in HF-deficiënt plasma na contact met glas, waarmee Margolis^{36,88} voor het eerst de betekenis van de Hageman factor voor de vorming van plasmakinines aantoonde. Margolis constateerde bovendien dat de geactiveerde Hageman factor zijn werking uitoefent door een pro-enzym - door de auteur component A genoemd - om te zetten in een actief enzym dat op zijn beurt het kinine vrijmaakt uit het overeenkomstige substraat. Door Webster en Ratnoff⁷⁶ werd geen toename in de vasodilatatie waargenomen met HF-deficiënt plasma, behandeld met celite of aceton, een defect dat hersteld kon worden door toevoeging van gedeeltelijk gezuiverde Hageman factor. Hiermee werd waarschijnlijk dat component A en kallikreinogeen identieke componenten zijn, die aanleiding kunnen geven tot kallikreïnevorming in aanwezigheid van de Hageman factor. Of de Hageman factor zelf een kallikreinogenase is of een ander enzym dat bij deze omzetting van invloed is, kon niet worden uitgemaakt.

Door Margolis is aangetoond dat de aanwezigheid van de Hageman factor eveneens noodzakelijk is voor de vorming van de capillaire permeabiliteitsfactor, een proces dat tevens de aanwezigheid van kallikreinogeen vereist. Mason en Miles⁸⁹ suggereerden dat de geactiveerde Hageman factor eerst een interactie aangaat met het enzym "permeabiliteitsfactor", dat vervolgens het kallikreinogeen kan activeren. Latere onderzoeken van Ratnoff en Miles⁸¹ toonden aan dat deze interactie een enzymatisch proces is waarbij de geactiveerde Hageman factor reageert met de door Mill c.s.⁹⁰ gepostuleerde propermeabiliteitsfactor. Het gevormde produkt zou dan voor de activering van het kallikreinogeen verant-

woordelijk kunnen zijn. Of echter de permeabiliteitsfactor een wezenlijk andere substantie is dan plasmakallikreïne, is onwaarschijnlijk, gezien de resultaten van Davies en Lowe⁹¹. In figuur 3 is de functie van de Hageman factor in het proces van de bloedstolling aangegeven, evenals de plaats in het proces van de kininevorming, waarbij de permeabiliteitsfactor van een vraagteken is voorzien.



Figuur 3: De betekenis van de Hageman factor in het proces van de bloedstolling, de fibrinolyse en de kininevorming.

Een geheel ander proces, dat echter nauw met het proces van de bloedstolling en de kininevorming samenhangt, is de fibrinolyse. Wanneer de bloedstelping tot stand is gekomen en een stolsel is gevormd, moet dit laatste op den duur weer opgeruimd en afgebroken worden, een proces dat fibrinolyse wordt genoemd. Het op gang komen van de fibrinolyse heeft veel gemeen met het bloedstollingsproces; de fibrinolyse verloopt echter langzamer, zodat altijd eerst fibrine gevormd kan worden vooraleer het opgelost wordt.

Het enzym dat het oplossen van het fibrinestolsel veroorzaakt, is het proteolytisch enzym plasmine. Normaal komt dit als zodanig niet in het bloed voor, wel echter een voorloper ervan, het plasminogeen. Het vrijcirculerende plasminogeen wordt voor een gedeelte tijdens de stolling aan het fibrine geadsorbeerd en zo in het stolsel opgenomen.

Zowel het geadsorbeerde als het vrije plasminogeen kan door verschillende activatoren in plasmine omgezet worden. Een dergelijke activator kan - in analogie met de extrinsieke en intrinsieke stolling - afkomstig zijn uit de weefsels (weefsel activator) of uit het plasma zelf (plasma activator). Fibrinolytische activatoren worden behalve in plasma ook in allerlei andere lichaamsvloeistoffen en in vrijwel alle weefsels aangetroffen. Ook bepaalde bacteriën, zoals streptokokken en stafylokokken produceren stoffen die sterk werkzaam zijn als activatoren van het fibrinolytische systeem.

Alle genoemde componenten zijn in staat menselijk plasminogeen zowel in vrije als in geadsorbeerde toestand te activeren. Het vrije plasmine kan behalve fibrine eveneens fibrinogeen, proaccelerine en factor VIII proteolytisch aantasten. Bovendien is plasmine in staat de bovengenoemde kinines te vormen. Of dit geschiedt door kininogeen rechtstreeks in kinine om te zetten, zoals o.a. door Rocha e Silva⁹² aangenomen wordt, of indirect geschiedt door activering van kallikreinogeen⁹³, is nog een punt van controverse. Onder normale omstandigheden wordt vrij plasmine onwerkzaam gemaakt door in het bloed aanwezige anti-plasminen; het plasmine, geadsorbeerd aan het stolsel, onttrekt zich aan deze inactivatoren. Wanneer bovendien in aanmerking genomen wordt dat de omzetting van plasminogeen autokatalytisch verloopt, blijkt voldoende garantie aanwezig om het stolsel op te lossen.

Door Niewiarowski en Prou-Wartelle⁹⁴ is voor het eerst een versnellende invloed aangetoond van de Hageman factor op het proces der fibrinolyse. Iatridis en Ferguson⁹⁵ hebben dit verschijnsel nader geanalyseerd en concludeerden dat de geactiveerde Hageman factor enzymatisch verantwoordelijk is voor de vorming van de plasma activator uit de overeenkomstige "plasma pro-activator". Het bestaan van deze z.g. pro-activator is echter nooit aangetoond. Men heeft namelijk alleen vastgesteld dat streptokinase het runderplasminogeen niet, maar menselijk plasminogeen wel kan activeren, reden waarom de aanwezigheid van een pro-activator in het menselijk plasminogeen werd verondersteld. Men zou echter met meer grond dit verschil in werking als een soortspecifiek verschil in reactiviteit van de twee plasminogenen kunnen verklaren. Ondanks deze onzekerheid over het bestaan van een pro-activator wordt een correlatie tussen de Hageman factor en de fibrinolyse niet betwijfeld.

In figuur 3 is schematisch de onderlinge samenhang tussen de processen van fibrinolyse, bloedstolling en kininevorming weergegeven. Hierbij is duidelijk komen vast te staan dat deze processen, die onderling grote gelijkenis vertonen, door hetzelfde enzym op gang gebracht kunnen worden, namelijk door de geactiveerde Hageman factor.

2.5 PROBLEMEN OMTRENT DE CONTACTFASE

Bij de gegeven overzichten van onze huidige kennis over het activeringsmechanisme van de Hageman factor en de rol die activerende oppervlakken hierbij spelen, is het nog gebrekkige inzicht in deze problemen duidelijk aan het licht getreden. Ondanks de reeds bereikte resultaten, is dit eveneens zo gesteld met de interactie van de Hageman factor en het PTA. De vraag zou gesteld kunnen worden of enkele conclusies niet zo vaak beklemtoond zijn, dat de waarnemingen voor andere interpretaties ontoegankelijk zijn geworden. Aan enkele problemen kan dit mogelijk worden toegelicht:

a. het karakter van de activering

Zoals onder 2.2 reeds is uiteengezet, beschouwt Margolis³⁷ het activeringsmechanisme van de Hageman factor als een ontrollen van het molecuul aan het oppervlak. Hierbij wordt aangenomen dat de activering volledig is, indien voldoende oppervlak aanwezig is om alle moleculen in de ontronde toestand te brengen; is het oppervlak daarentegen beperkt, dan vindt slechts een onvolledige ontrolling plaats. Deze moleculen kunnen volgens Margolis nog een verdere activering ondergaan. Hoewel het niet expliciet is vermeld, wordt het activeringsmechanisme als een irreversibel proces beschouwd. Een irreversibele activering wordt eveneens door Ratnoff c.s.^{34,35} verondersteld. Het feit dat de geïsoleerde Hageman factor het PTA kan activeren in afwezigheid van een activerend oppervlak, doet de auteur concluderen dat de Hageman factor zich reeds in de actieve vorm bevindt. Een dergelijke veronderstelling zou pas volledig kunnen worden bevestigd, indien de enzymatische werking van de geïsoleerde Hageman factor even snel zou zijn zowel in aanwezigheid als in afwezigheid van een activerend oppervlak. Hoewel de irreversibele activering algemeen wordt aanvaard, is ons inziens hiervoor geen volledig bewijs gegeven; de mogelijkheid dat de activering reversibel is, zou bestaande contradicties kunnen opheffen.

b. de aard en stabiliteit van het contactproduct

Het contactproduct dat tijdens het glascontact in normaal plasma wordt gevormd, is eveneens wat zijn samenstelling betreft nog niet geheel duidelijk. Zoals reeds onder 2.3 is uiteengezet, is duidelijk komen vast te staan dat voor het vormen van het contactproduct zowel HF, PTA als een activerend oppervlak noodzakelijk zijn. Door vele auteurs wordt aangenomen dat de Hageman factor door contact met het oppervlak wordt geactiveerd. Of hierbij - zoals door Ratnoff c.s. wordt aangenomen - de inactieve Hageman factor wordt geadsorbeerd, dan geactiveerd en vervolgens in de actieve toestand in oplossing gaat, of volgens Hardisty en Margolis⁴¹ aan het oppervlak blijft geadsorbeerd en slechts in de geadsorbeerde toestand zijn werking uitoefent, is niet opgehelderd. Deze verwarde toestand is ons inziens te benaderen met de vraag: wat is

aan het oppervlak geadsorbeerd? Dat beide opvattingen mogelijk voor een andere interpretatie vatbaar zijn, blijkt uit het feit dat het contactprodukt, bereid uit normaal plasma, zowel de stollingstijd van HF-deficiënt als van PTA-deficiënt plasma kan verkorten⁷³. Hieruit zou geconcludeerd mogen worden dat zowel HF als PTA aan het actieve oppervlak geadsorbeerd zijn. Daarmee in overeenstemming zijn de bevindingen van Vroman⁶², die een adsorptie van zowel HF als PTA aan glasoppervlakken constateerde. Door Soulier en Prou-Wartelle⁶⁷ werd een adsorptie van PTA uit normaal plasma aan celite waargenomen. Deze adsorptie was echter beduidend minder wanneer het PTA uit HF-deficiënt plasma werd geadsorbeerd. Het uit HF-deficiënt plasma geadsorbeerde PTA bevond zich bovendien in de inactieve vorm⁶⁷. Door Nossel⁷³ werd vastgesteld dat de PTA-adsorptie aan celite steeds gepaard gaat met een gelijktijdige adsorptie van HF. Deze enigszins verwarde opsomming van gegevens doet vermoeden dat HF en PTA min of meer onafscheidelijk aan glasoppervlakken gebonden worden en er bovendien geen activering van het PTA kan optreden, wanneer niet reeds de Hageman factor aan het glasoppervlak geadsorbeerd is. Hierbij rijst ons inziens de vraag of niet het versnellende effect van activerende oppervlakken in de stolling gezien moet worden als een preferent adsorberen en zodoende samenbrengen van de beide reactiepartners, HF en PTA. Het glasoppervlak activeert dan niet de Hageman factor zelf, doch werkt katalytisch op de interactie van HF en PTA door preferente adsorptie van beide aan het oppervlak.

Door enkele auteurs is een instabiliteit van het contactprodukt beschreven. Ratnoff⁹⁶ vond redenen om aan te nemen dat dit veroorzaakt wordt door een remmer van de Hageman factor. Nossel en Niemetz⁹⁷ vonden aanwijzingen voor een enzymatische inactivering van het contactprodukt, terwijl Margolis⁷⁹ een plasma antagonist voor mogelijk houdt. Zolang niet duidelijk kan worden aangegeven wat de rol is van actieve oppervlakken bij de activering van de Hageman factor en zolang het reversibele of irreversibele karakter hiervan niet is vastgesteld, zijn bovengenoemde resultaten voor andere interpretaties toegankelijk.

Enkele problemen zijn hier slechts aangegeven; vele andere, zoals het enzymatisch karakter van de Hageman factor, de stabiliteit, remmers etc. moeten nog onderzocht worden. In dit proefschrift zullen de resultaten besproken worden die met deze problemen voor ogen, bij het biochemisch en stollingsfysiologisch onderzoek van de Hageman factor verkregen zijn.

Het experimentele gedeelte omvat de isolatie van de Hageman factor uit runderplasma, beschreven in Hoofdstuk IV, voorafgegaan door een beschrijving van de methoden die toegepast zijn, om de Hageman factor activiteit te bepalen.

In Hoofdstuk V wordt het enzymatisch karakter van de Hageman

factor aan de hand van zijn esterase en proteolytische eigenschappen toegelicht. Hoofdstuk VI vermeldt de resultaten die verkregen zijn bij de koolhydraatanalyse van de Hageman factor, en geeft een korte uiteenzetting van de rol van het sialinezuur bij de enzymatische eigenschappen van deze factor. Na een korte vermelding van enkele gemeten fysisch-chemische grootheden, volgen in het laatste hoofdstuk (VIII) de resultaten die met de gezuiverde factor bij het stollingsonderzoek zijn verkregen.

HOOFDSTUK III

DE BEPALINGSMETHODEN VOOR DE HAGEMAN FACTOR ACTIVITEIT

„Like the climber who has to contend with increasing difficulties as he increases his distance from his base camp, the investigator of the early stage of clotting finds his difficulties and errors increasing, as his point of interest becomes further removed from the observable stage of fibrin formation.”

R.G. Macfarlane

3.1 INLEIDING

Strikt genomen dient men voor de bepaling van de Hageman factor activiteit het corrigerend effect te bepalen dat toediening van een te onderzoeken preparaat aan een patiënt met een HF-deficiëntie op diens stollingsdefect uitoefent. Daar een dergelijke bepalingsmethode in de praktijk niet uitvoerbaar is, moest aanvankelijk worden volstaan met de bepaling van het corrigerend vermogen op de gestoorde stolling van HF-deficiënt plasma in vitro. Wij waren ons ervan bewust dat in deze proefopstelling alle stoffen met een stollingbevorderende werking Hageman factor activiteit bedriegelijk kunnen nabootsen. Toch was deze methode aanvankelijk de enige waarover wij bij de zuivering van de Hageman factor uit runderplasma beschikten.

Toen in een later stadium bleek dat gezuiverde Hageman factor preparaten een esterase activiteit voor α -N-benzoyl-L-arginine ethylester (BAEE) vertoonden, kon van een tweede criterium gebruik gemaakt worden. Aan de voorwaarde dat de esterase activiteit aan de Hageman factor inherent is, bleek te worden voldaan. Bij de isolatie is aanvankelijk de bepalingsmethode, gebaseerd op de esterase eigenschappen van de Hageman factor, als controle gebruikt naast de stollingsmethode. De grotere reproduceerbaarheid van de eerste is doorslaggevend geweest bij het interpreteren van de resultaten.

De bepalingsmethode van de Hageman factor met HF-deficiënt plasma, die in samenwerking met Haanen ontwikkeld is, is reeds elders uitvoerig beschreven⁹⁸, zodat wij ons kunnen beperken tot een beknopte

beschrijving van de uitvoering. Er zal nader worden ingegaan op de reproduceerbaarheid van de resultaten die met deze methode verkregen werden. De bepalingmethode van de esterase activiteit wordt in dit hoofdstuk slechts kort beschreven; de verdere bijzonderheden komen uitvoerig ter sprake in Hoofdstuk V.

3.2 BEPALING VAN DE HAGEMAN FACTOR ACTIVITEIT MET HF-DEFICIENT PLASMA

3.2.1 Principe

Plasma, deficiënt in één van de factoren die verantwoordelijk zijn voor de vorming van de intrinsieke protrombine activator*), vertoont een verlengde "protrombine activator-vormingstijd"¹⁾. Dit betekent dat, ondanks de aanwezigheid van protrombine en fibrinogeen in fysiologische concentratie, de tijd die nodig is om het fibrinestolsel te laten vormen, in sterke mate is verlengd in vergelijking met die van normaal plasma. Door toevoeging van de ontbrekende factor aan het deficiënte plasma kan deze lange vormingstijd verkort worden, waarbij een empirische relatie kan worden opgesteld tussen de opgetreden correctie en de hoeveelheid toegevoegde factor. Van dit principe wordt gebruik gemaakt om de Hageman factor kwantitatief te bepalen. Als voorwaarde geldt dat het plasma slechts deficiënt mag zijn in één stollingsfactor en wel die, waarvan de activiteit bepaald moet worden.

Door Haanen c.s.^{12,13} is een patiënte beschreven die alléén een HF-deficiëntie vertoonde en het plasma van deze patiënte is als testplasma bij ons onderzoek gebruikt.²⁾

Zoals reeds in 1.3 is uiteengezet, zijn voor de vorming van de protrombine activator behalve de eiwit-stollingsfactoren ook fosfolipiden uit de bloedplaatjes noodzakelijk. In vitro kan als vervanging hiervoor een uit sojabonen verkregen "lecithine"-suspensie worden gebruikt.

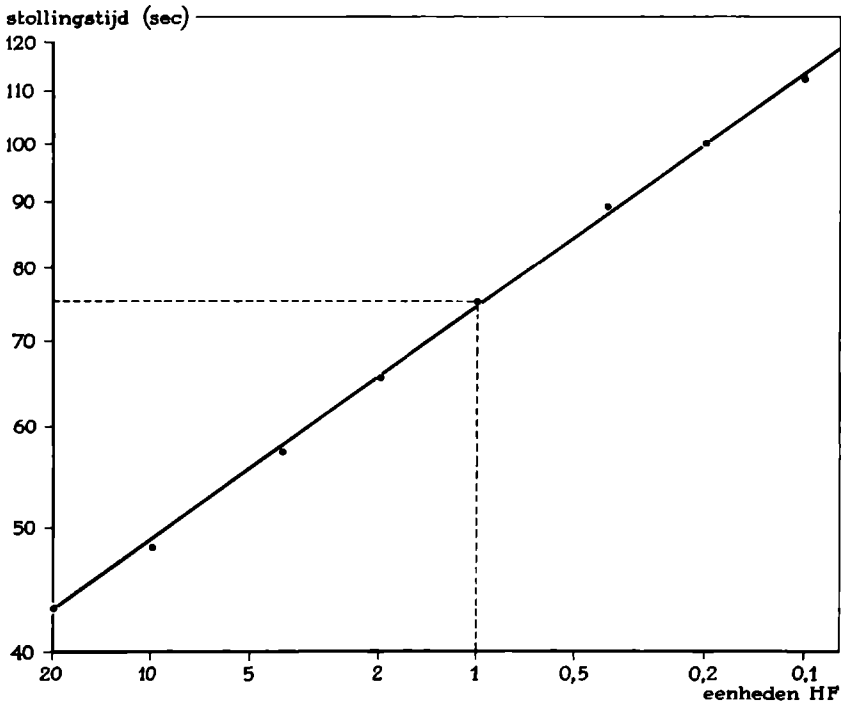
Omdat de Hageman factor in een inactieve en een actieve vorm kan voorkomen, moet, om vergelijkbare resultaten te verkrijgen, voor een maximale activering worden gezorgd, hetgeen geschiedt door de stollingstest uit te voeren in aanwezigheid van kaoline, zoals beschreven door Margolis⁹⁹. In de praktijk worden "lecithine" en kaoline gelijktijdig toegevoegd in de vorm van een lecithine-kaoline suspensie, bereid volgens de methode van Rapaport c.s.¹⁰⁰.

1) Met de termen protrombine activator en protrombine activator-vormingstijd worden dezelfde grootheden bedoeld als de in de stollingsfysiologie hiervoor gebruikelijke termen tromboplastine en tromboplastinevormingstijd.

2) Gaarne memoreren wij hier de bereidwilligheid van deze patiënte om voor dit onderzoek haar bloed ter beschikking te stellen en danken wij H.B. Benraad, internist, voor de hierbij verleende bemiddeling.

3.2.2 Uitvoering

De methode voor de bepaling van de Hageman factor is - enkele wijzigingen uitgezonderd - identiek aan de door Rapaport c.s.⁹⁹ beschreven methode voor de bepaling van de PTA activiteit. Achtereenvolgens worden gepipetteerd: 0,1 ml HF-deficiënt citraatplasma, 0,1 ml van het te onderzoeken monster, dat tevoren 50 maal verdund is met Owren's buffer¹⁰¹ (pH 7,35; ionensterkte 0,154) en 0,1 ml van een lecithine-kaoline suspensie¹⁰⁰. Na een incubatietijd van exact 6 minuten bij 37°C wordt 0,1 ml 0,033 M CaCl₂ toegevoegd en de stollingstijd gemeten. Dit is de tijd, die verloopt vanaf het toevoegen van Ca⁺⁺-ionen tot het moment waarop de vorming van fibrine zichtbaar wordt.



Figuur 4: Lineair verband tussen de stollingstijd en de hoeveelheid Hageman factor op logaritmische schaal

Testsysteem: 0,1 ml HF-deficiënt plasma, 0,1 ml Hageman factor en 0,1 ml lecithine-kaoline suspensie werden 6 min. bij 37°C geïncubeerd, waarna 0,1 ml 0,033 M CaCl₂ werd toegevoegd en de stollingstijd gemeten. Per definitie is de hoeveelheid Hageman factor die een stollingstijd geeft van 75 sec., op 1 E gesteld.

Door een reeks verdunningen van een Hageman factor preparaat te bereiden en de stollingstijd hiervan op bovengenoemde wijze te meten,

kan een z.g. referentiecurve worden opgesteld. Indien de gemeten stollingstijden op dubbel-logaritmische schaal uitgezet worden tegen de hoeveelheid toegevoegde Hageman factor, wordt een lineair verband verkregen: zie figuur 4. Arbitrair werd 1 eenheid Hageman factor gedefinieerd als die hoeveelheid actief materiaal die in staat is de stollingstijd tot 75 seconden te verkorten; deze is identiek aan de elders gedefinieerde eenheid⁹⁸. Om praktische redenen werd ieder monster waarvan de Hageman factor activiteit bepaald moest worden, vooraf verdund tot een eiwitgehalte van 0,5 mg per ml, zodat na 50 maal verdunnen met Owren's buffer slechts 1 μ g eiwit aan het testsysteem werd toegevoegd.

Als maat voor de zuiverheid van de onderzochte fracties werd de specifieke Hageman factor activiteit gebruikt, aangevend het aantal Hageman factor eenheden per mg eiwit. Deze grootte - in dit proefschrift aangeduid met SHFA - werd verkregen door het aantal eenheden, via de referentiecurve gevonden, met 1000 te vermenigvuldigen.

3.2.3 Reproduceerbaarheid

De grootste beperking die aan de meetmethode van de intrinsieke stolling verbonden is, vormt het feit dat slechts het eindproduct van dit proces waarneembaar is. Begrijpelijk is het daarom dat de reproduceerbaarheid van de bepalingmethode vermindert naarmate de reactie die de te onderzoeken factor veroorzaakt, verder verwijderd is van deze eindreactie. Enkele factoren die de reproduceerbaarheid in sterke mate beïnvloeden, zijn:

A. de pH en ionensterkte van het testmonster

Zoals reeds elders uitvoerig is beschreven⁹⁸, worden slechts dan betrouwbare stollingstijden gemeten, indien het toegevoegde testmonster de fysiologische pH en ionensterkte bezit; een voorafgaande verdunning van 50 maal met Owren's buffer bleek hiervoor noodzakelijk.

B. de volgorde van toevoeging van de verschillende reactiecomponenten in het testsysteem

De stollingstest moet daarom nauwgezet op dezelfde manier en in dezelfde volgorde van manipulaties worden uitgevoerd*).

C. de lecithine-kaoline suspensie

Bij de bereiding van de lecithine suspensies wordt niet altijd eenzelfde optimaal actieve hoeveelheid fosfolipiden verkregen, hetgeen merkbare verschillen in de stollingstijd tot gevolg heeft bij gebruik van verschillende lecithine suspensies. Om deze verschillen zo veel mogelijk uit te sluiten hebben wij gebruik gemaakt van een lecithine-kaoline sus-

*) Veel dank is verschuldigd aan Mej.G.E.Morselt voor de nauwgezetheid waarmee de stollingstests voor ons werden uitgevoerd.

TABEL 2

Stollingstijden van het standaard Hageman factor preparaat, getest in verschillende verdunningen op HF-deficiënt plasma *)

	Stollingstijd van het standaard HF-preparaat **) (sec.)			
Verdunning	1 : 10	1 : 33	1 : 50	1 : 100
	58	-	84	-
	59	74	86	92
	58	73	85	89
	58	77	86	90
	60	75	85	90
	60	75	85	-
	59	78	86	92
	58	78	87	91
	62	74	82	96
	59	-	84	-
Gemiddeld	59,1	75,5	85,0	91,4
Variatiebreedte	4	5	5	7

*) Bepaald met verschillende ampullen van het standaardpreparaat en HF-deficiënt plasma.

**) Stollingstijden in kolom 1, 2 en 4 zijn verkregen van 22-2-'62 tot 6-6-'62, die in kolom 3 van 26-9-'62 tot 11-1-'63.

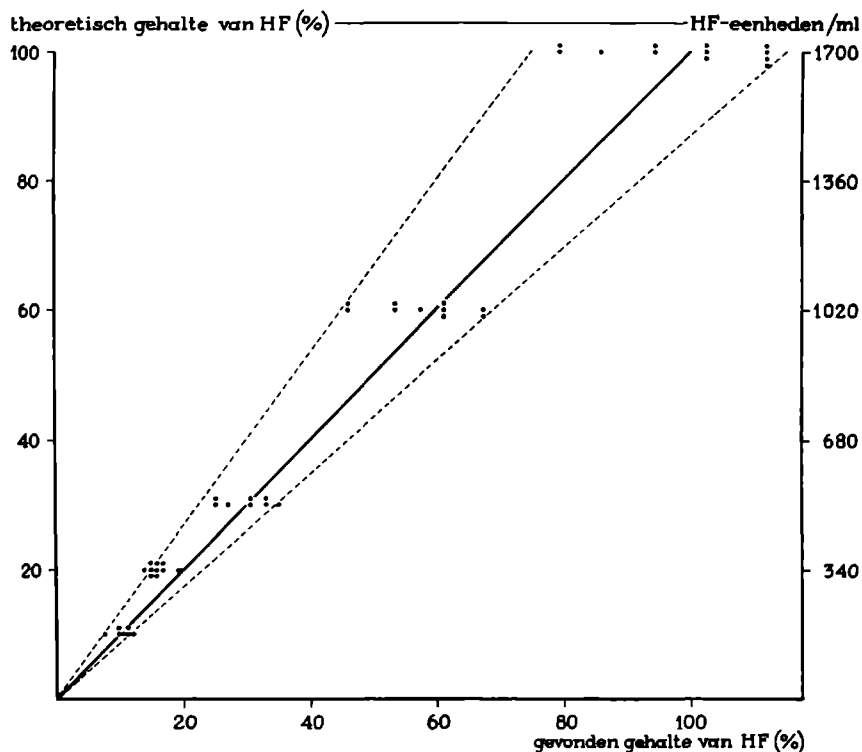
pensie, welke in kleine hoeveelheden in ampullen werd gelyofiliseerd¹⁾ en bij -20°C bewaard.

D. het HF-deficiënte plasma

Omdat het HF-deficiënte plasma, zelfs van één patiënt, in deficiëntie kan verschillen, vormt een standaardisering van de methode een groot probleem. Om deze verschillen te vermijden, werd van een grote hoeveelheid HF-deficiënt plasma gebruik gemaakt, welke eveneens in kleine hoeveelheden (1 ml) werd gelyofiliseerd¹⁾ en bij -20° bewaard.

1) Deze lyofilisering werd uitgevoerd door bemiddeling van Prof. Dr. J. Polderman, Research Laboratorium, N.V. Organon, Oss, waarvoor wij onze erkentelijkheid betuigen.

Slechts onder deze omstandigheden en bij gebruik van gelyofiliseerde reagentia kon een goede reproduceerbaarheid van de bepalingsmethode verkregen worden. In tabel 2 zijn de stollingstijden weergegeven die gedurende enkele maanden met eenzelfde Hageman factor preparaat werden verkregen. Het preparaat bestond uit citraat-runderplasma dat met Al(OH)_3 -gel was behandeld (zie Hoofdstuk IV) en daarna analoog aan de bovengenoemde reagentia in kleine hoeveelheden gelyofiliseerd was. Uit de resultaten blijkt dat er naast een goede reproduceerbaarheid van de stollingstijden, bovendien een bevredigende stabiliteit bestaat in het HF-deficiënt plasma en het standaard Hageman factor preparaat. Desondanks is een variatie in de stollingstijd van ongeveer 6-7% niet uitgesloten, hetgeen o.a. veroorzaakt wordt door het moeilijk exact te bepalen moment van fibrinevorming.



Figuur 5: Waargenomen spreiding in de bepaling van bekende hoeveelheden Hageman factor, uitgevoerd volgens de methode beschreven onder 3.2.2. Het standaard Hageman factor preparaat (Al(OH)_3 -gel runderplasma) werd resp. 10, 16½, 33, 50 en 100 maal verdund. De verdunning 1 : 10 is als 100% Hageman factor gesteld, met een gevonden gemiddelde van 1700 eenheden/ml.

Ook al is deze variatie in de stollingstijd relatief klein, voor de hieruit te interpoleren stollingsactiviteit is ze niet te verwaarlozen. In figuur 5 is de waargenomen variatie in de stollingstijd, gemeten met verschillende hoeveelheden toegevoegde Hageman factor, uitgedrukt in termen van stollingsactiviteit. De waargenomen variatie in de stollingstijd, die als een aan de testmethode inherente variatie kan worden beschouwd, heeft in stollingsactiviteit een spreidingsbreedte van ongeveer 20% van de gemiddelde waarde tot gevolg. Dit betekent dat bepalingen aan Hageman factor preparaten met 1500-2000 eenheden per ml een zelfde mate van betrouwbaarheid of, zo men wil, onbetrouwbaarheid vertonen als overeenkomstige bepalingen met minder dan 200 eenheden/ml, ondanks het feit dat bij de laatste van een veel grotere variatie in de stollingstijd sprake is. De testmethode is dus wel uitermate geschikt om lage concentraties van de Hageman factor (bv. een HF-deficiëntie) aan te tonen, maar het is niet mogelijk kleine verschillen bij zowel lage als hoge activiteiten te bepalen. Beduidend ongunstig wordt deze betrouwbaarheid bij nog hogere Hageman factor concentraties. Zoals uit louter enzymkinetische overwegingen verwacht kan worden, zal het in figuur 4 aangegeven lineair verband niet meer gelden, wanneer van zodanig hoge concentraties gebruik wordt gemaakt dat van een nulde orde reactie tijdens de incubatie geen sprake meer is. De stollingstijd nadert een limietwaarde bij toenemende Hageman factor concentraties, hetgeen een veel grotere spreidingsbreedte in deze activiteiten met zich meebrengt.

Dit probleem deed zich voor tijdens de zuivering van de Hageman factor uit runderplasma. Om de stollingsactiviteiten met een noodzakelijke betrouwbaarheid te kunnen meten, moest ieder testmonster naar een laag Hageman factor gehalte worden teruggebracht. Dit laatste kon worden bereikt door een zodanige verdunning toe te passen dat slechts 1 μ g eiwit aan het testsysteem werd toegevoegd. In het beginstadium van de isolatie van de Hageman factor bleek een dergelijke verdunning te voldoen, maar bij verdere zuivering van de Hageman factor bleek zelfs deze extreme verdunning als standaard te hoog gekozen. Bij verdere zuivering werden namelijk stollingsactiviteiten van 5000 à 10.000 eenheden per ml gemeten, hetgeen niet verwacht kon worden. Om de betrouwbaarheid van de bepaling te vergroten, werd steeds een stollings-test in duplo uitgevoerd en gelijktijdig het standaard Hageman factor reagens als controle meebepaald.

Een tweede probleem ontstond, toen bleek dat één portie gelyofiliseerd HF-deficiënt plasma niet voldoende was voor het gehele onderzoek en wij genoodzaakt waren een nieuwe hoeveelheid HF-deficiënt plasma te lyofiliseren. Beide hoeveelheden plasma toonden echter een duidelijk verschil in HF-deficiëntie; werd namelijk het standaard Hageman factor preparaat op beide getest, dan bleek een verschil van 20 seconden in de stollingstijd op te treden (zie tabel 3).

Om dezelfde absolute waarde van de stollingsactiviteit te behouden, zou

TABEL 3

Verschil in stollingstijden bij verschillende porties HF-deficiënt plasma*)

Aantal experimenten	Verdunning Standaard HF-preparaat	Gemiddelde stollingstijd (sec.)	
		HF-def. plasma I	HF-def. plasma II
10	1 : 50	85,0	65,9

*) Bepaald met verschillende ampullen van zowel standaardpreparaat als HF-deficiënt plasma I en II.

eennieuwedefinitie van de Hageman factor eenheid noodzakelijk geweest zijn. De eenheid bleef echter gehandhaafd, waarbij geaccepteerd werd dat er een verschil in de gemeten stollingsactiviteit ging optreden, indien van het nieuwe HF-deficiënte plasma gebruik gemaakt werd. In dit proefschrift wordt bij de tabellen vermeld, welk HF-deficiënt plasma gebruikt is.

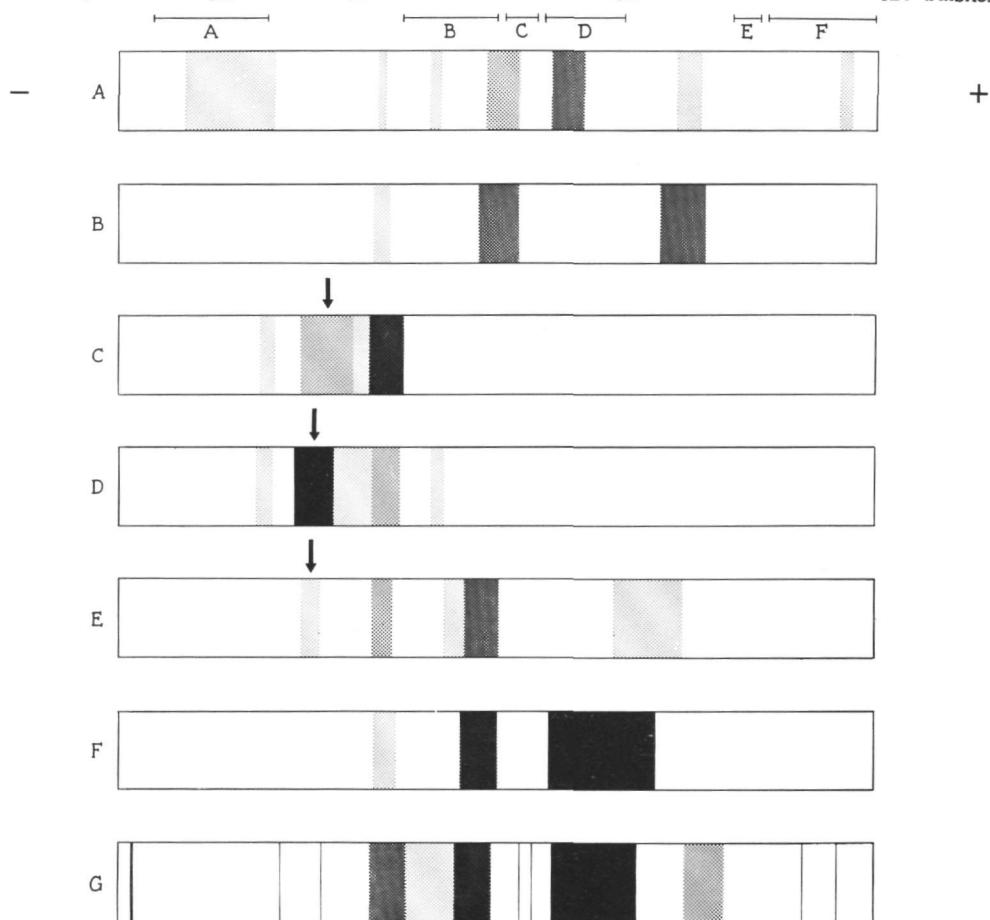
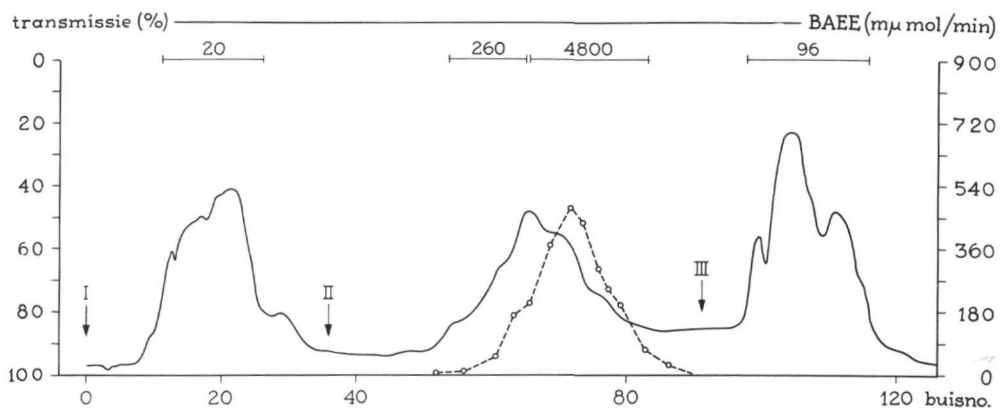
3.2.4 Specificiteit

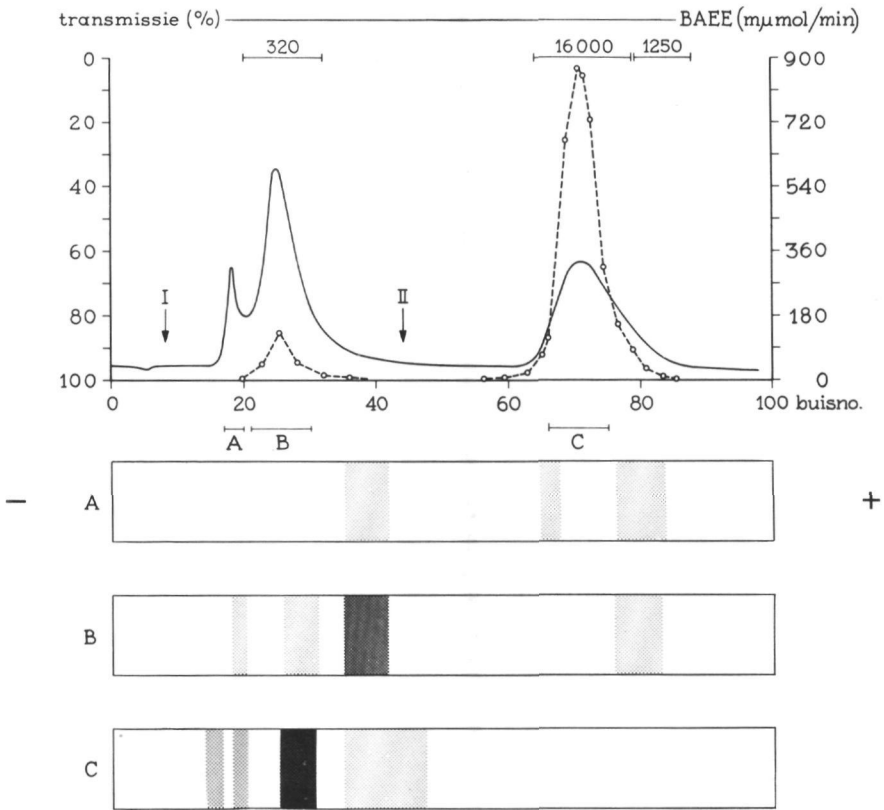
Hoewel de stollingstest berust op het corrigeren van een duidelijk omschreven deficiëntie, is hij niet volledig specifiek. Met name factor XI (PTA) en factor IX (Christmas factor) kunnen tot schijnbare Hageman factor activiteiten aanleiding geven⁹⁸. De oorzaak hiervan is gelegen in het feit dat, wanneer de factoren IX en XI zich in de geactiveerde toestand bevinden, deze de contactfase niet meer nodig hebben en dus het stapsgewijze mechanisme van de bloedstolling direct op gang kunnen brengen of althans versnellen. Het enige criterium dat toegepast kan worden om Hageman factor activiteit met zekerheid vast te stellen, is het vermogen van de onderzochte preparaten om HF-deficiënt plasma te corrigeren, zonder dat een correctie optreedt van andere deficiënties, met name PTA-deficiënt plasma.

3.3 BEPALING VAN DE HAGEMAN FACTOR ACTIVITEIT MET BAEE

3.3.1 Principe

De tweede methode ter bepaling van de Hageman factor activiteit berust op het door ons waargenomen katalyserende effect¹⁰² van de Hageman factor op de hydrolyse van N-gesubstitueerde-L-arginine esters zoals BAEE.

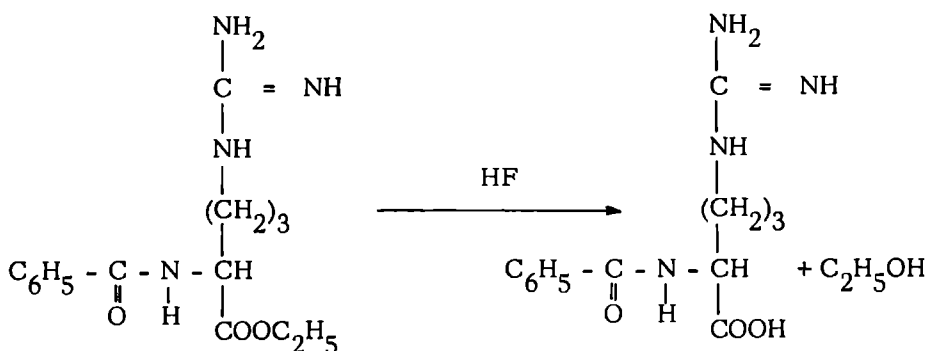




Figuur 7a: Zuivering van HF door rechromatografie over CM-Sephadex C-50 Kolomafmetingen 35 x 2 cm, fractievolume 5 ml. Het eiwit (CM-fractie I; totaal 138 mg) werd geëluëerd met de volgende buffers: I. 0,3 M NaCl in 0,15 M acetaatbuffer pH 5,2. II. Lineaire gradiënt van 0,3 M naar 0,85 M NaCl in 0,15 M acetaatbuffer pH 5,2. Steilheid van de gradiënt 2,5 mM.ml⁻¹. — UV-absorptie bij 254 mμ; ○---○ esterase activiteit. De getallen boven de haken (—) geven aan de SHFA van de overeenkomstig verzamelde fracties.

Figuur 7b: Polyacrylamide-gel elektroforese in het discontinue buffersysteem volgens Ornstein en Davies¹¹³ van de fracties verkregen na CM-Sephadex rechromatografie. De elektroforetische omstandigheden zijn beschreven onder figuur 6b. Hoeveelheid opgebracht eiwit 90-110 μg.

Bij de volgende zuiveringsstap werd de fractie D, die rijk is aan Hageman factor, opnieuw aan chromatografie over CM-Sephadex onderworpen, doch ditmaal onder gewijzigde omstandigheden. Zoals uit het verloop van de eerste gradiënt-elutie kon worden afgeleid, bleek de Hageman factor bij een concentratie van 0,5 M NaCl in 0,15 M acetaatbuffer pH 5,2 van de kolom te worden geëluëerd. Daarom werd bij de rechromato-



α -N-Benzoyl-L-Arginine ethylester
(BAEE)

α -N-Benzoyl-L-Arginine

Bij de bepaling wordt gebruik gemaakt van het verschil in lichtabsorptie tussen het geïoniseerde zuur en de ester. Omdat het ontstane zuur een grotere UV-absorptie bezit bij 254 m μ (zie Hoofdstuk V 5.4), kan de hydrolyse spectrofotometrisch gevolgd worden. De hydrolysesnelheid, die gemeten wordt als de toename in de extinctie per tijdseenheid, is lineair afhankelijk van de hoeveelheid toegevoegde Hageman factor, zodat een bepaling van de Hageman factor activiteit door meting van de hydrolysesnelheid van BAEE mogelijk is.

3.3.2 Uitvoering

De uitvoering van de bepaling is analoog aan de methode, zoals die beschreven is door Schwert en Takenaka¹⁰³ voor het meten van de trypsin activiteit. De bijzonderheden, zoals pH optimum, substraatconcentratie, ionensterkte e.d. worden beschreven in Hoofdstuk V, zodat hier alleen de uitvoering vermeld wordt.

Alle enzymatische metingen werden uitgevoerd bij 37°C met een Zeiss-spectrofotometer PMQ II bij een versterking 1/10/10. De metingen geschieden als volgt: als blanco werd gebruikt een mengsel van 0,3 ml H₂O en 3,0 ml vers bereide substraatoplossing, bevattende 0,001 M BAEE in 0,10 M Tris-HCl buffer (pH 8,5). Het reactiemengsel bestond uit 0,05 - 0,3 ml Hageman factor oplossing, aangevuld met H₂O tot 0,3 ml, en 3,0 ml substraatoplossing. Na mengen werd de extinctie van het reactiemengsel afgelezen bij 254 m μ en wel iedere 15 seconden, beginnend na 1 minuut en eindigend na 5 minuten. Onmiddellijk daarna werd ter controle de extinctie van de blanco afgelezen. Een verandering van de ingestelde nulwaarde als gevolg van spontane hydrolyse werd bij de

meetwaarde in rekening gebracht. De toename in extinctie per minuut werd vervolgens omgerekend in de grootheid " $\mu\text{mol BAEE gehydrolyseerd/min}$ " door deling met een omrekeningsfactor 0,30. De factor werd als volgt afgeleid: het gemeten extinctieverschil tussen 1 mM BAEE en 1 mM BA onder dezelfde omstandigheden als in de test is toegepast, bedroeg $0,99 \pm 0,04$. De omrekeningsfactor, verkregen door 0,99 te delen door het reactievolume 3,3 ml, geeft derhalve de extinctieverandering aan bij omzetting van 1 $\mu\text{mol BAEE}$.

Onder de specifieke esterase activiteit wordt in dit proefschrift verstaan de grootheid $\mu\text{mol BAEE gehydrolyseerd/min}$ per mg eiwit. Het hiervoor noodzakelijke eiwitgehalte werd bepaald volgens de methode van Lowry c.s.¹⁰⁴, waarbij gebruik werd gemaakt van runderalbumine als referentiecurve.

3.3.3 Specificiteit

De bepalmingsmethode van de Hageman factor activiteit met behulp van de hydrolyse van BAEE, is evenmin specifiek voor deze factor. Met name enkele proteolytische enzymen, waartoe ook enige stollingsfactoren behoren, zijn in staat deze ester te hydrolyseren. Derhalve is de bepalmingsmethode alleen dan specifiek voor de Hageman factor als geen van de desbetreffende enzymen aanwezig is.

HOOFDSTUK IV

ISOLATIE VAN DE HAGEMAN FACTOR UIT RUNDERPLASMA

„It might be that the blood of these patients, though failing to react to glass, reacts normally to physiological trauma. If this is so, then a large part of what has been written, thought and taught about bloodcoagulation is based on one of the most extensively studied artefacts in the history of biology.”

R.G. Macfarlane

4.1 INLEIDING

Sinds de ontdekking van de Hageman factor door Ratnoff en Colopy¹⁰ zijn uitvoerige onderzoekingen verricht betreffende het mechanisme waarop deze factor in staat is het stollingsproces op gang te brengen. Vele pogingen zijn aangewend om deze stollingsfactor te isoleren en ook gedurende ons onderzoek zijn vele bijdragen van andere laboratoria gepubliceerd welke in belangrijke mate richting hebben gegeven aan de zuiveringsprocedure die door ons uiteindelijk werd toegepast.

Zo werd in 1959 door Hardisty en Margolis⁴¹ een zuiveringsmethode beschreven, waarbij de Hageman factor aan glaspapels werd geadsorbeerd en daarna bij verhoogde pH werd geëluëerd. Schiffman c.s.⁷⁴ verkregen een scheiding van de Hageman factor en het PTA door chromatografie van menselijk plasma over DEAE-cellulose. In 1960 slaagden Haanen c.s.¹³ erin een ca. 500-voudige zuivering te verkrijgen door adsorptie van de Hageman factor aan glaspoeder en erop volgende elutie bij pH 9,6, gevolgd door gefractioneerde uitzouting van het eluaat. Yin en Duckert¹⁰⁵ beschreven een zuiveringsprocedure welke bestond uit een BaSO₄-behandeling van menselijk plasma, gevolgd door selectieve precipitatie met (NH₄)₂SO₄ en verwijdering van de euglobulinen door iso-elektrische precipitatie. Vervolgens werd de Hageman factor geadsorbeerd aan celite en geëluëerd met 7% NaCl, maar de verkregen fractie was nog sterk verontreinigd met PTA. In 1961 werd door Ratnoff c.s.³⁴ een 100-voudige zuivering van de Hageman factor verkregen uit PTA-deficiënt plasma door behandeling met Al(OH)₃-gel, gevolgd door adsorptie aan CM-cel-

lulose bij pH 5,2 en elutie bij pH 6,8 met 1 M NaCl. Didisheim¹⁰⁶ bereikte een 8-10 voudige en een 100-400 voudige zuivering door respectievelijk zetmeelgel elektroforese en CM-cellulose chromatografie op met BaSO₄-behandeld serum toe te passen.

In 1962 - het jaar waarin ons onderzoek naar de isolatie van de Hageman factor uit runderplasma een aanvang nam - werd door Ratnoff en Davie³⁵ een isolatiemethode beschreven die resulteerde in een 3000-5000 voudige zuivering. Bij deze methode werd gebruik gemaakt van Al(OH)₃-gel en celite behandeling, adsorptie aan CM-cellulose bij pH 5,2 en elutie bij pH 6,8, gevolgd door (NH₄)₂SO₄ precipitatie en chromatografie over CM- en DEAE-cellulose bij pH 5,2 resp. 7,45.

De door ons gebruikte methode is ten dele gebaseerd op de ervaringen van bovengenoemde auteurs, die echter - in tegenstelling tot ons - de Hageman factor uit menselijk plasma zuiverden.

De ter beschikking staande technieken voor het scheiden van ingewikkelde eiwitmengsels zoals deze in plasma aangetroffen worden, hebben vooral door de ontwikkeling van selectieve "molecuulzeven" en ionenwisselaars op cellulose- of dextranbasis een hoge graad van perfectie bereikt. Bij de door ons toegepaste zuiveringsprocedure is veelvuldig van deze chromatografische scheidingsmethoden gebruik gemaakt. De algemene methodiek die bij deze chromatografie wordt toegepast, wordt bekend verondersteld en wij volstaan met een verwijzing naar enkele uitstekende overzichtsartikelen.¹⁰⁷⁻¹¹⁰

4.2 MATERIALEN

Citraat-runderplasma. Als uitgangsmateriaal voor de isolatie van de Hageman factor werd runderbloed*) gebruikt dat met 1/10 volume 3,8% natrium-citraatoplossing (Na₃C₆H₅O₇·2H₂O) onstolbaar gemaakt was. Na centrifugeren bij 3500 x g gedurende 60 minuten werd het citraatplasma van het sediment gescheiden en direct daarna voor isolatie gebruikt.

Glaspoeder (Pyrex, 100-350 mesh, Pulles en Hanique, Eindhoven) werd enkele malen mechanisch geroerd in 4 N HCl en vervolgens gewassen tot neutrale pH. Deze procedure werd daarna op dezelfde wijze met 2 N NaOH uitgevoerd. Op analoge manier werd reeds gebruikt glaspoeder geregeneerd.

Aluminiumhydroxide gel. (Al(OH)₃ moist gel, B.D.H.). Een suspensie werd bereid door 400 ml water aan 100 g moist gel toe te voegen en gedurende 10 minuten intensief te roeren.

*) Om een hoeveelheid van ca. 1800 liter runderbloed voor ons "op te vangen" zijn wij de heren J.A. van Alfen, H.W. Derksen, G. van Gent en J.C. Teunissen bijzonder veel dank verschuldigd.

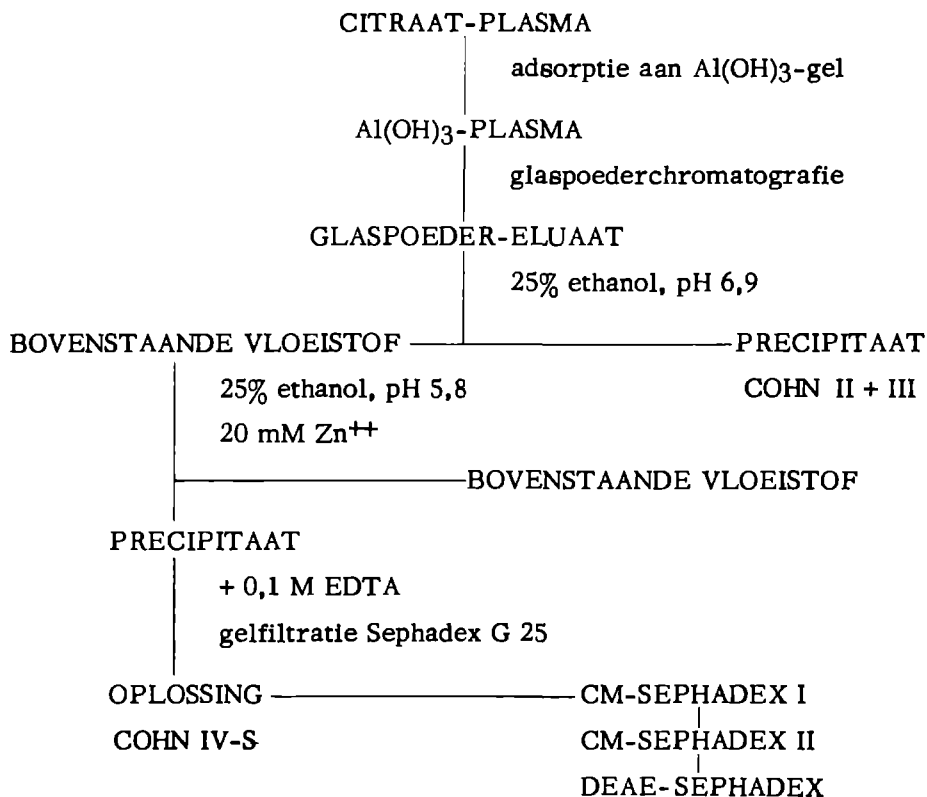
Sephadex. Type G 25, medium, 100-250 mesh, wateropneming 2,5 g per gram droge stof.

CM (carboxymethyl)-Sephadex. Type C 50, medium, 100-250 mesh, capaciteit 4,5 meq. per gram droge stof.

DEAE (diethylaminoethyl)-Sephadex. Type A 50, medium, 100-250 mesh, capaciteit 3 meq. per gram droge stof.

S C H E M A I

Isolatie van de Hageman factor uit runderplasma



4.3 ISOLATIEMETHODE

Alvorens de afzonderlijke stappen van de isolatie te bespreken, wordt in schema I de werkwijze verduidelijkt. De isolatie bestaat uit 6 afzonderlijke gedeelten:

1. adsorptie van citraat-runderplasma aan $\text{Al}(\text{OH})_3$ -gel
2. adsorptiechromatografie aan glaspoeder

3. fractionering met ethanol bij lage temperatuur om de eiwitfractie, Cohn IV-S genoemd, te verkrijgen
4. chromatografie over CM-Sephadex
5. rechromatografie over CM-Sephadex
6. chromatografie over DEAE-Sephadex.

Teneinde de laatste zuiveringsfase met succes te kunnen uitvoeren, diende óf telkens een hoeveelheid van ca. 65 liter runderbloed tegelijk te worden verwerkt of moesten de eerste stappen met telkens gedeelten van deze hoeveelheid worden uitgevoerd. Om praktische redenen is aan de laatste werkwijze de voorkeur gegeven.

4.3.1 Adsorptie aan $\text{Al}(\text{OH})_3$ -gel en glaspoederchromatografie

De waarneming van Hardisty en Margolis⁴¹ en van Haanen c.s.¹³ dat de Hageman factor uit menselijk plasma gemakkelijk aan glasoppervlakken adsorbeert en geëluëerd kan worden onder zwak alkalische omstandigheden, bleek ook voor de Hageman factor uit runderplasma te gelden. Aanvankelijk werd bij de isolatie van de Hageman factor het citraatplasma direct voor glaspoederchromatografie gebruikt¹³. Dit gaf echter misleidende resultaten. Het bleek ons⁹⁸ namelijk dat behalve de Hageman factor ook andere stollingsfactoren in het citraatplasma de stollingstest beïnvloedden en zo een foutieve indruk van de Hageman factor activiteit van het plasma of de plasma fracties veroorzaakten. Het betrof hier met name de activiteit van de stollingsfactoren IX en XI, die dus vooraf verwijderd behoorden te worden. Hiervoor maakten wij gebruik van $\text{Al}(\text{OH})_3$ -gel, dat de eigenschap bezit factor IX (Christmas), factor II (protrombine), factor VII (proconvertine), factor X (Stuart-Prower) en gedeeltelijk ook factor XI (PTA) uit citraat-plasma te adsorberen. Een incubatie van het plasma met 1/10 volume $\text{Al}(\text{OH})_3$ -gel suspensie gedurende 15 minuten bij 37°C bleek hiervoor voldoende.

De adsorptie van de Hageman factor aan glaspoeder geschiedde door het plasma, dat vooraf met $\text{Al}(\text{OH})_3$ -gel was behandeld, te percoleren over vier chromatografiekolommen, gestapeld met Pyrex glaspoeder in water (100 x 7 cm; nat volume van de kolomvulling 2300 ml). Per kolom werd 2000 ml plasma opgebracht. Na percolatie werden de glaskolommen gewassen met 0,15 M NaCl tot in het eluaat vrijwel geen eiwit meer aanwezig was ($E_{280\text{ m}\mu}^{\text{cm}} < 0,05$). De hierna volgende elutie is - op kleinere schaal - zowel bij neutrale als verhoogde pH met buffers van 0,1 M en hogere molariteiten onderzocht. Hierbij werd de hoogste opbrengst verkregen met 1 M NaCl in 0,1 M glycine-NaOH buffer pH 9,6 en deze is dan ook bij de definitieve werkwijze toegepast. Het eluaat werd in fracties opgevangen met behulp van een fractieverzamelaar (LKB, Stockholm), voorzien van een bij 254 m μ continu registrerende UV-absorp-

tiemeter (Uvicord, LKB, Stockholm) en de fracties welke één piek in de absorptiecurve vormden, werden samengevoegd. Na een bepaling van de Hageman factor activiteit werd onmiddellijk overgegaan tot fractionering met ethanol, beschreven onder 4.3.2.

Opgemerkt dient nog te worden dat behalve aan glaspoeder eveneens adsorptie van de Hageman factor waargenomen is aan kaoline, BaCO_3 , bentoniet, kiezelgel, noritpoeder, uraatkristallen, CM-cellulose, collageen etc. De vraag of betere resultaten met deze adsorbentia verkregen kunnen worden, is niet nader te beantwoorden; de methode van Iatridis en Ferguson⁹⁵ met kaoline als adsorbens bleek in ons geval althans tot een geringere opbrengst te leiden.

Van een aantal glaspoederfracties is de specifieke Hageman factor activiteit (SHFA) in tabel 4 weergegeven. Uit de getallen blijkt dat de zuivering welke met glaspoederchromatografie verkregen werd, gemiddeld 230 maal bedraagt met een opbrengst in Hageman factor eenheden van 32%. De specifieke Hageman factor activiteit van de glaspoederfracties bedraagt gemiddeld 2275 en is berekend naar het corrigerend vermogen op de stollingstijd van HF-deficiënt plasma II. In deze tabel zijn de volumina, de eiwitgehalten en de totale hoeveelheden eiwit van ieder plasma en elke plasmafractie achterwege gelaten. Een volledig omschreven voorbeeld van de resultaten, verkregen tijdens een gehele zuivering, is weergegeven in tabel 9. Als toelichting op tabel 4 geldt het volgende: de hoeveelheid eiwit waarvan bij ieder experiment werd uitgegaan, bedroeg 560-700 gram, afkomstig van 8000 ml Al(OH)_3 -plasma, met een gemiddeld eiwitgehalte van 76 mg/ml. De hoeveelheid eiwit die na glaspoederchromatografie werd verkregen, was sterk variërend en bedroeg 760-1040 mg, afkomstig van 900-1250 ml glaspoedereluaat met een eiwitgehalte van gemiddeld 0,88 mg/ml. Zoals reeds onder 3.2.3 opgemerkt is, bleek een portie HF-deficiënt plasma voor ons onderzoek niet voldoende en waren wij genoodzaakt van een nieuwe hoeveelheid gelyofiliseerd HF-deficiënt plasma gebruik te maken. Beide porties vertoonden echter een verschillende mate van deficiëntie, hetgeen tot gevolg had, dat identieke fracties, wanneer ze met deze twee verschillende plasma's op HF activiteit werden getest, een opmerkelijk verschil in stollingsactiviteit vertoonden. In tabel 5 is dit voor een aantal experimenten weergegeven. Tevens is van een aantal fracties de esterase activiteit gemeten voor BAEE. Hoewel geenszins gesteld mag worden dat deze esterase activiteit alleen van de Hageman factor afkomstig is, blijkt toch een zekere parallellisme in stolling en esterase activiteit te bestaan. Opmerkelijk is dat de esterase activiteit een kleinere spreiding te zien geeft, waarmee de geringere betrouwbaarheid van de bepaling van de stollingsactiviteit wordt geaccentueerd (Tabel 5).

T A B E L 4

Zuivering van de Hageman factor door glaspoederchromatografie *)

Experiment No.	Al(OH) ₃ -plasma SHFA	Glaspoeder-fractie SHFA	Zuiverings-factor	Opbrengst **) in %
1	11	2045	186	20
2	7	3015	430	41
3	18	1485	83	8
4	5	1850	370	38
5	10	2440	244	25
6	12	1670	139	18
7	7	4660	665	78
8	10	2880	288	31
9	7	1605	230	35
10	14	4440	317	59
11	10	3015	301	42
12	11	2660	242	39
13	8	2350	294	43
14	10	1485	148	21
15	10	1330	133	20
16	16	1290	80	11
17	11	2015	183	22
18	13	1730	133	23
19	9	2160	240	-
20	10	1335	134	34
Gemiddeld	10	2275	227	32

*) Berekend naar het corrigerend vermogen op de stollingstijd van HF-deficiënt plasma II.

**) Het totaal aantal eenheden van het Al(OH)₃-gel plasma, waaruit de overeenkomstige glaspoederfractie is bereid, is op 100% gesteld.
Voor nadere bijzonderheden wordt verwezen naar de tekst.

TABEL 5

Specifieke Hageman factor activiteit
bij gebruik van verschillend HF-deficiënt plasma
en de overeenkomstige esterase activiteit

Aantal (N) Experimenten	HF-deficiënt plasma	Al(OH) ₃ - plasma SHFA	S.D. *)	Glaspoeder- fractie SHFA	S.D. *)
20	HF-def. (II)	10	± 3	2275	± 930
15	HF-def. (I)	3	± 2	480	± 230
15	Esterase **) Activiteit	1,6	$\pm 0,4$	119	± 26

*) Standaard deviatie: $\sqrt{\frac{N \sum X^2 - (\sum X)^2}{N}}$

**) Uitgedrukt in $\mu\text{moles BAEE min}^{-1} \cdot \text{mgr}^{-1} \text{ eiwit}$.

4.3.2 Fractionering met ethanol

Gezien het grote volume van de glaspoederfracties - ca. 1000 ml met een eiwitgehalte van slechts 0,9 mg per ml - was het om praktische redenen wenselijk als volgende zuiveringsstap een precipitatie uit te voeren. Hiertoe werd de voorkeur gegeven aan een gefractioneerde precipitatie met ethanol bij lage temperatuur, zoals door Cohn en medewerkers voor plasma ontwikkeld is. De Cohn methode VI¹¹¹, oorspronkelijk door ons toegepast¹¹⁹, werd slechts ten dele gehandhaafd. Hierbij werd de Hageman factor geprecipiteerd bij een ethanolpercentage van 40% en pH 5,8, nadat eerst inactief eiwit was verwijderd bij 25% ethanol en pH 6,9. Een precipitatie met minder denaturatieverschijnselen werd bereikt door de precipitatie bij 40% ethanol te vervangen door een precipitatie bij 25% ethanol in aanwezigheid van Zn^{++} -ionen, volgens de Cohn methode X¹¹². Het zink-eiwit precipitaat werd daarna door toevoeging van EDTA weer opgelost en het eiwit werd bevrijd van het Zn-EDTA complex door gelfiltratie.

De fractionering werd als volgt uitgevoerd: aan de glaspoederfracties, die in een methanolbad van lage temperatuur werden gekoeld, werd langzaam onder intensief roeren 96% ethanol (-30°C) toegevoegd tot een eindconcentratie van 25% (v/v) ethanol; de snelheid van toevoeging was zodanig dat een temperatuur van -5°C gehandhaafd bleef. Vervolgens werd met 1 M azijnzuur de pH op 6,9 gebracht en de oplossing gedurende een nacht bij -7°C bewaard. Het gevormde precipitaat, Cohn II + III genoemd, werd door centrifugeren verwijderd en aan de bovenstaande vloeistof

TABEL 6

Zuivering van de Hageman factor door fractionering met ethanol *)

Glaspoeder-fractie		Cohn II + III		Cohn IV-S		Opbrengst in % **)	SHFA Cohn IV-S
SHFA	Eenheden (x10 ⁻³)	SHFA	Eenheden (x10 ⁻³)	SHFA	Eenheden (x10 ⁻³)		SHFA Glaspoeder- fractie
2045	1622	495	119	2440	1090	67	1,2
3015	2565	50	17	7140	1994	78	2,4
1485	1348	-	-	2880	738	55	1,9
1850	1408	72	20	3285	765	54	1,8
2440	2020	1085	243	2550	681	34	1,1
1670	1052	170	41	11280	1782	(169)	(6,7)
4660	3644	80	25	3150	905	25	0,7
2880	2180	400	134	2880	785	36	1,0
1605	1484	40	11	1250	573	39	0,8
2660	2625	16	8	2440	992	38	0,9
2350	2173	138	29	755	454	21	0,3
1485	1312	72	31	2440	642	49	1,6
1330	1375	434	165	1920	956	70	1,4
1290	1189	1130	322	7570	2446	(205)	(5,9)
1730	4606	50	107	2530	1456	32	1,5
2160	5220	1165	1196	3740	3560	68	1,7
2165		360		3640		47	1,3
Gemiddeld							

*) Berekend naar het corrigerend vermogen op de stollingstijd van HF-deficiënt plasma II.

**) De opbrengst is berekend voor de Cohn IV-S fracties, waarbij het aantal eenheden van de overeenkomstige glaspoederfractie op 100% is gesteld. Voor nadere bijzonderheden wordt verwezen naar de tekst.

werd een 0,25 M zinkacetaatbuffer (pH 5,5) in 25% ethanol toegevoegd tot een eindconcentratie van 20 mM Zn^{++} . De pH van het resulterende mengsel werd, indien nodig, ingesteld op pH 5,8. Na een periode van 12 uur bij $-70^{\circ}C$ werd het gevormde zink-eiwit precipitaat afgezonderd door centrifugeren - 15 minuten bij 9000 x g en $-70^{\circ}C$ - en direct daarna opgelost in 10 ml 0,1 M EDTA. De lichtgeel gekleurde eiwitoplossing werd bevrijd van het Zn-EDTA complex en de overmaat EDTA door gelfiltratie over een kolom (40 x 2,5 cm) met Sephadex G 25, geëquilibreerd met 0,15 M natriumacetaatbuffer pH 5,2. Het eluaat werd in fracties opgevangen en daarna op aanwezigheid van EDTA en Hageman factor activiteit getest. De eiwitfracties die Hageman factor activiteit vertoonden, werden vervolgens verzameld (Cohn IV-S fractie) en lyofiel gedroogd.

In tabel 6 zijn de resultaten van de fractionering met ethanol weergegeven. De specifieke Hageman factor activiteit (SHFA) van de fracties Cohn II + III en Cohn IV-S, aangegeven in kolom 3 en 5 van de tabel, wijzen op de aanwezigheid van de Hageman factor in de laatste fractie. In kolom 7 is de procentuele opbrengst aan HF-eenheden aangegeven, welke uit de overeenkomstige glaspoederfractie (100%) werd berekend. Bij deze tabel dient te worden opgemerkt dat tijdens het oplossen van het Cohn II + III precipitaat een grote hoeveelheid (gedenatureerd) eiwit niet in 0,15 M NaCl was op te lossen. De getallen in kolom 3 en 4 hebben betrekking op de bovenstaande eiwitoplossing, na centrifugeren van het gedenatureerde eiwit. De hoeveelheid eiwit in deze bovenstaande vloeistof varieerde van 240-430 mg, de hoeveelheid eiwit in Cohn IV-S na gelfiltratie bedroeg 260-600 mg, met als gemiddelde hoeveelheid 360 mg. De zuivering, verkregen door deze fractionering met ethanol (kolom 8), is niet hoog. Door uitvoering van deze Cohn II + III precipitatie werd echter alle in glaspoederfracties aanwezige fibrinolytische activiteit verwijderd (Hoofdstuk VIII), zodat wij de hier gegeven werkwijze gehandhaafd hebben.

4.3.3 Chromatografie over CM-Sephadex

De zuivering van de Hageman factor door chromatografie met ionenwisselaars is, wat de uitvoering betreft, niet wezenlijk verschillend van andere enzymzuiveringen waarbij deze materialen gebruikt zijn. De algemene technieken welke hierbij worden toegepast, zijn uitvoerig beschreven in de literatuur¹⁰⁷⁻¹¹⁰, zodat wij ons kunnen beperken tot een beknopte weergave van de methodiek.

De voorbehandeling en regeneratie van de ionenwisselaars evenals de stapeling van de kolommen (35 x 1,8 cm, met koelmantel) geschiedde op de aanbevolen wijze. Tijdens het stapelen werd de doorstroomsnelheid steeds gehandhaafd op die snelheid welke bij de uiteindelijke elutie gewenst werd; deze bedroeg voor CM-Sephadex C 50 ongeveer 30 ml per uur. Na langdurig wassen van de gestapelde kolommen met 0,15 M na-

triumacetaatbuffer pH 5,2 werden 2 Cohn IV-S fracties tezamen opgebracht, welke voorafgedialyseerd waren tegen dezelfde buffer. De elutie vond plaats door continue toename van de ionensterkte bij constante pH, waarvoor het lineaire gradiëtsysteem volgens Parr¹¹⁸ gebruikt werd. Het eluaat werd in fracties van 5 ml opgevangen. De beste resultaten werden verkregen door de hiergenoemde elutiesystemen in deze volgorde toe te passen:

- I. 0,15 M natriumacetaatbuffer pH 5,2
- II. lineaire ionensterkte gradiënt van 0,15 M acetaatbuffer pH 5,2 naar 1 M NaCl in dezelfde buffer met een steilheid van 4,0 mM.ml⁻¹
- III. 1 M NaCl in 0,15 M glycine-NaOH buffer pH 9,5.

In figuur 6a is een elutiediagram weergegeven, zoals dat met bovengenoemde systemen verkregen werd. Alle fracties werden op esterase activiteit getest en daarna verzameld zoals in de haakjes aangegeven staat. Van de zo verkregen fracties werd tevens de stollingsactiviteit bepaald en deze is als specifieke activiteit (SHFA) boven de desbetreffende haken in getalwaarde aangegeven.

Om meer informatie over de mate van zuivering te verkrijgen, werd telkens een aantal fracties verzameld waarvan een micro-polyacrylamide elektroforese werd uitgevoerd volgens de disc-techniek van Ornstein en Davies¹¹³. Zoals uit de verkregen eiwitpatronen blijkt (figuur 6b), vertoont het uitgangsmateriaal Cohn IV-S (patroon G) een bijzonder hoog α_2 -globuline-gehalte, dat volledig gescheiden van de Hageman factor actieve fractie D in de laatste eiwitpieken teruggevonden wordt. De Hageman factor bevattende fracties waren weliswaar nog heterogeen en varieerden bij verschillende experimenten van samenstelling, doch alle verkregen elektroforesepatronen van deze fracties vertoonden één gemeenschappelijke band - aangegeven met pijl. Opgemerkt dient nog te worden dat elk elektroforesepatroon afzonderlijk is ontwikkeld met in totaal ongeveer 100 μ g eiwit, zodat een vergelijking van de banden onderling meer dan alleen kwalitatieve informatie biedt.

Figuur 6a: Zuivering van HF door chromatografie over CM-Sephadex C-50 Kolomafmetingen 35 x 2 cm, fractievolume 5 ml. Het eiwit (2 Cohn IV-S fracties; totaal 780 mg) werd geëluëerd met de volgende buffers: I. 0,15 M natriumacetaat buffer pH 5,2. II. Lineaire gradiënt van 0,15 M acetaatbuffer pH 5,2 naar 1 M NaCl in dezelfde buffer. Steilheid van de gradiënt 4,0 mM.ml⁻¹. III. 1 M NaCl in 0,15 M glycine-NaOH buffer pH 9,5. — UV-absorptie bij 254 m μ ; ○--○ esterase activiteit. De getallen boven de haken (|—|) geven aan de SHFA van de overeenkomstig verzamelde fracties.

Figuur 6b: Polyacrylamide-gel elektroforese in het discontinue buffersysteem volgens Ornstein en Davies¹¹³ van de fracties verkregen na CM-Sephadexchromatografie. Cylinderdimensies 60 x 6,5 mm. De elektroforese geschiedde bij een constante stroomsterkte van 5 mA per cylinder, met een variërend voltage van 40 - 50 V/cm. Tijdsduur 40-50 min. Kleuring: amidozwart. Hoeveelheid opgebracht eiwit 100-120 μ g.

TABEL 7

Zuivering van de Hageman factor
door chromatografie en rechromatografie over CM-Sephadex *)

COHN IV-S		CM-SEPHADEX I		CM-SEPHADEX II		Zuiverings- factor **)	Op- brengst in % **)
esterase- activiteit	stollings- activiteit	esterase- activiteit	stollings- activiteit	esterase- activiteit	stollings- activiteit		
186	670	905	2660	2845	8450	15	47
129	810	765	3740	1520	7300	12	48
180	-	1092	-	1901	-	11	49
150	815	555	3285	1910	17400	13	36
141	645	903	2160	1960	4400	14	39
119	1920	424	6180	1433	17400	12	67
109	620	548	1990	1502	6480	14	73
89	380	482	1670	2076	11280	23	29
257	1430	602	4040	1905	-	7	58
172	895	345	3420	2170	8450	13	43
77	580	388	3890	1220	-	16	47
222	1290	786	2880	2344	8900	11	71
153	915	650	3265	1898	10000	13	50
Gemiddeld							

*) Stollingsactiviteit is berekend naar het corrigerend vermogen op de stollings-tijd van HF-deficiënt plasma I en uitgedrukt in SHFA. Esterase activiteit is uitgedrukt in $\mu\text{mol BAEE min}^{-1}, \text{mg}^{-1}$ eiwit.

**) De zuivering en de opbrengst zijn berekend voor de CM-Sephadex II fracties op basis van de esterase activiteit, waarbij het aantal esterase eenheden van de overeenkomstige Cohn IV-S fractie op 100% is gesteld.

grafie begonnen met 0,3 M NaCl in 0,15 M acetaatbuffer pH 5,2, overeenkomend met de elutieconcentratie der belangrijkste verontreiniging, gevolgd door een minder steile gradiënt, lopend van 0,3 M NaCl in 0,15 M acetaatbuffer pH 5,2 naar 0,85 M NaCl in dezelfde buffer met een steilheid van $2,5 \text{ mM.ml}^{-1}$. Het resultaat van een dergelijke rechromatografie is afgebeeld in figuur 7a. Overeenkomstig de verwachtingen bleek nu een aanzienlijk gedeelte van het inactieve eiwitmateriaal te zijn gescheiden van de fracties met Hageman factor. Analyses van de laatste vertoonden bovendien een duidelijke verhoging in zowel esterase als stollings-

activiteit. Het voorlopig ongegronde vermoeden dat de reeds bij de eerste chromatografie geconstateerde esterase activiteit een enzymatische reflectie van de Hageman factor zou kunnen zijn, werd versterkt door het volledig samenvallen van beide onder gewijzigde chromatografische omstandigheden.

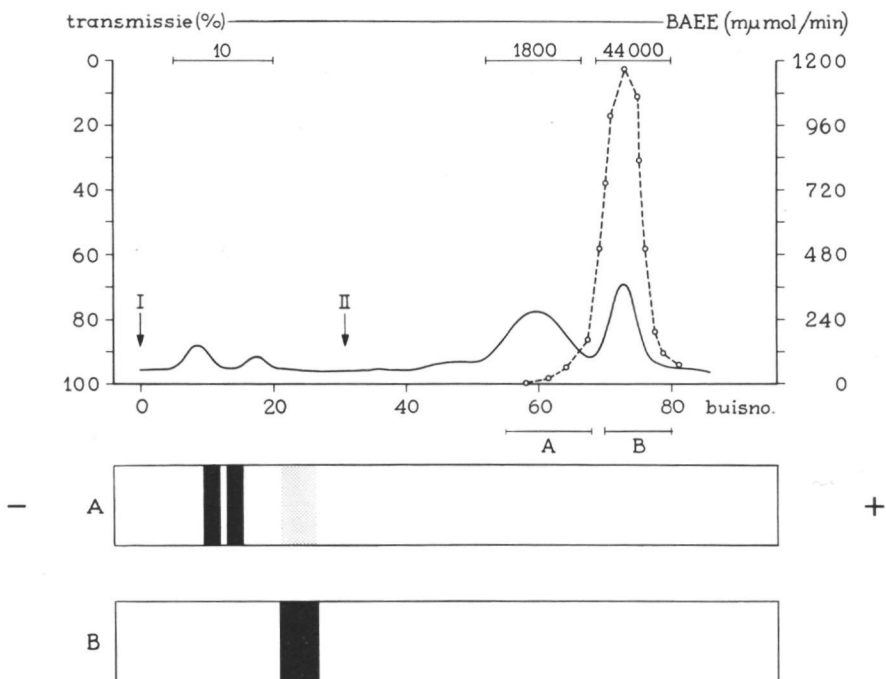
Bovengenoemde zuivering werd eveneens geconstateerd in de disc-elektroforesepatronen van de desbetreffende chromatografische fracties. Bovendien vertoonde de fractie die de Hageman factor activiteit bevatte - in figuur 7b patroon C - nu duidelijk de band welke op grond van vergelijking reeds eerder aan de stollingsfactor was toegeschreven.

De resultaten, welke door deze chromatografie en rechromatografie over CM-Sephadex werden bereikt, zijn voor enkele representatieve experimenten weergegeven in tabel 7. Behoudens de vermelding dat een gemiddelde toename in zuivering van 13 maal, een specifieke stollingsactiviteit van 10.000 en een esterase activiteit van 2000 $\text{m}\mu\text{mol BAEE min}^{-1}$ per mg eiwit werden bereikt behoeft deze tabel geen verdere toelichting.

4.3.4 Chromatografie over DEAE - Sephadex

Om de laatste verontreinigingen van de Hageman factor te kunnen verwijderen, zijn theoretisch vele, in de praktijk slechts enkele technieken toepasbaar gebleken. Zo waren onze pogingen daartoe met preparatieve polyacrylamide elektroforese evenals gelfiltratie zonder succes. Chromatografie met DEAE-Sephadex A-50 als ionenwisselaar leverde uiteindelijk het bevredigende resultaat. Een goede scheiding werd verkregen door elutie met een 0,05 M Tris-HCl buffer pH 7,5, gevolgd door een lineaire gradiënt lopende van 0,05 M Tris-HCl buffer pH 7,5 naar 0,35 M NaCl in dezelfde buffer. De steilheid van de gradiënt evenals de elutiesnelheid werden beide gering gehouden teneinde de scheidingsmogelijkheden volledig te benutten. Bij een toegepaste steilheid van 1,10 mM. ml^{-1} en een elutiesnelheid van ca. 20 ml per uur werd een scheiding verkregen zoals die is afgebeeld in figuur 8a. De onder deze figuur afgebeelde disc-elektroforesepatronen vertonen nu slechts één band in de gezuiverde fractie, waarmee de hoge graad van zuiverheid werd aangetoond.

Zeer belangrijk is volgens ons de waarneming dat wederom de esterase en stollingsactiviteit in dezelfde fracties gelokaliseerd waren. De mogelijkheid dat de Hageman factor een esterase zou zijn, hetgeen door de bereikte elektroforetische zuiverheid werd geaccentueerd, heeft op het verdere verloop van ons onderzoek een bepalend stempel gedrukt. In tabel 8 zijn enkele resultaten van deze laatste zuiveringsstap aangegeven. Een esterase activiteit van 7200-7500 $\text{m}\mu\text{mol BAEE min}^{-1}\text{.mg}^{-1}$ eiwit werd enkele malen als hoogste waarde waargenomen. De specifieke stollingsactiviteit vertoont een relatief grote spreiding, hetgeen te wijten



Figuur 8a: Zuivering van HF door chromatografie over DEAE-Sephadex A-50. Kolomafmetingen 25 x 2 cm, fractievolumen 5 ml. Het eiwit (2 CM-fracties II; totaal 59 mg) werd geëluëerd met de volgende buffers: I, 0,05 M Tris-HCl buffer pH 7,5. II, Lineaire gradiënt van 0,05 M Tris-HCl buffer pH 7,5 naar 0,35 M NaCl in dezelfde buffer. Steilheid van de gradiënt 1,10 mM, ml⁻¹. — UV-absorptie bij 254 mμ; o---o esterasedactiviteit. De getallen boven de haken (—) geven aan de SHFA van de overeenkomstig verzamelde fracties.

Figuur 8b: Polyacrylamide-gel elektroforese in het discontinue buffersysteem volgens Ornstein en Davies¹¹³ van de fracties verkregen na DEAE-Sephadex chromatografie. De elektroforetische omstandigheden zijn beschreven onder figuur 6b. Hoeveelheid opgebracht eiwit 70-85 μg.

is aan de onnauwkeurigheid bij de bepaling van de stollingstijd (verschillen variërend tot 3-4 seconden) waaruit de stollingsactiviteit geïnterpoleerd wordt. Bovendien blijkt het verschijnsel dat bij hoge Hageman factor activiteiten niet meer wordt voldaan aan het lineaire verband tussen de stollingstijd enerzijds en de Hageman factor concentratie anderzijds, hier duidelijk merkbaar.

Intabel 9 is de gehele procedure voor één zuivering in getallen weergegeven, waarbij duidelijk de in vorige paragrafen omschreven graad van zuivering, activiteit en opbrengst na iedere afzonderlijke stap tot uiting komt.

T A B E L 8

Zuivering van de Hageman factor door chromatografie
over DEAE-Sephadex *)

CM-SEPHADEX II		DEAE-SEPHADEX		Zuiverings- factor **)	Opbrengst in % **)
esterase- activiteit	stollings- activiteit	esterase- activiteit	stollings- activiteit		
1960	4400	7450	12900	4	77
1760	3420	7200	22400	4	68
2250	11600	6060	-	3	89
3360	19200	6900	32000	2	72
1905	8220	5830	18000	4	93
2130	6480	7250	28000	3	70
1790	16000	7300	44000	4	74

*) Stollingsactiviteit is berekend naar het corrigerend vermogen op de stollings-tijd van HF-deficiënt plasma I en uitgedrukt in SHFA. Esterase activiteit is uitgedrukt in $\mu\text{mol BAEE min}^{-1}$, mg^{-1} eiwit.

**) Berekend op esterase activiteit, met CM-Sephadex II als uitgangsmateriaal.

T A B E L 9

Zuivering van de Hageman factor uit runderplasma

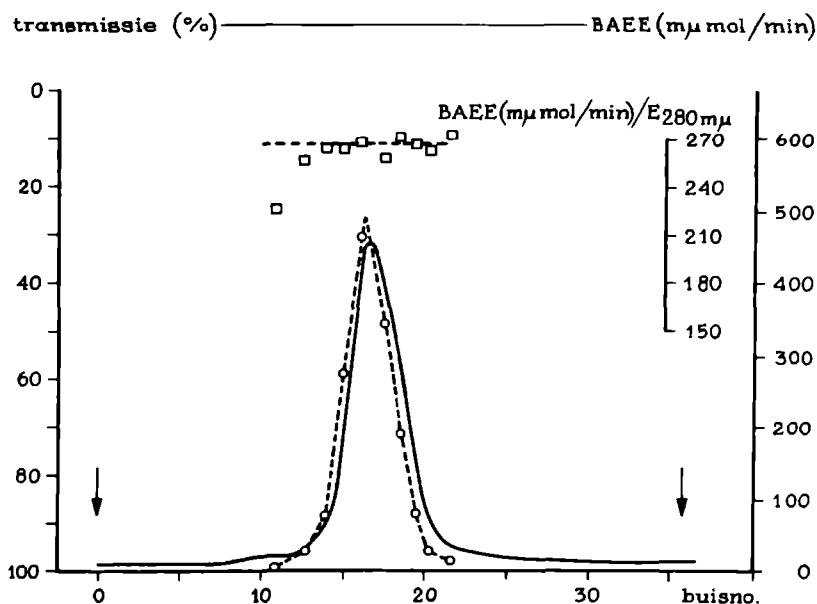
Fractie	Totaal eiwit (mg)	Stollings- activiteit (SHFA)	Esterase activiteit ($\mu\text{mol/min}$ /mg eiwit)	Totale stollings eenheden ($\times 10^{-3}$)	Totale esterase eenheden ($\times 10^{-3}$)	Opbrengst (%) **)
Al(OH) ₃ - plasma *)	2000.000	-	1,2	-	2400	100
Glaspoeder- eluaat *)	4400	1020	118	4480	520	22
Cohn (II + III) *)	1410	480	120	677	169	7
Cohn IV-S *)	1960	1700	155	3330	304	13
CM-Sephadex I	256	4300	510	1100	130	5,4
CM-Sephadex II	68	16000	1790	1088	122	5,1
DEAE-Sephadex	16	44000	7300	704	117	4,9

*) Gemiddelde waarde van 4 verschillende batches.

**) Opbrengst is berekend voor de esterase activiteit.

4.4 ZUIVERHEID VAN DE HAGEMAN FACTOR PREPARATEN

Over de graad van zuiverheid van onze preparaten moge nog het volgende opgemerkt worden. Wanneer de polyacrylamide elektroforese werd uitgevoerd bij een andere pH waarde nl. 4,5 volgens de methode van Reisfeld c.s.¹¹⁴, dan werd slechts één band waargenomen. Ook na elektroforese bij pH 9,5 in 6 M ureum werd slechts een band verkregen, vergezeld van een geringe diffuse nasleep. Een kolom-elektroforese experiment volgens Porath^{115,116} met Sephadex G 25 als inerte drager in triethylamine-bicarbonaatbuffer pH 7,4¹¹⁷ gaf een patroon zoals is afgebeeld in figuur 9. De esterase activiteit, gedeeld door de UV-absorptie bij 280 m μ , bleek voor de top en omliggende fracties een constante waarde op te leveren, waarmee de bereikte zuiverheid werd onderstreept. Het in een later stadium waargenomen gedrag in de ultracentrifuge - waarvoor naar Hoofdstuk VII verwezen wordt - was hiermee in overeenstemming.



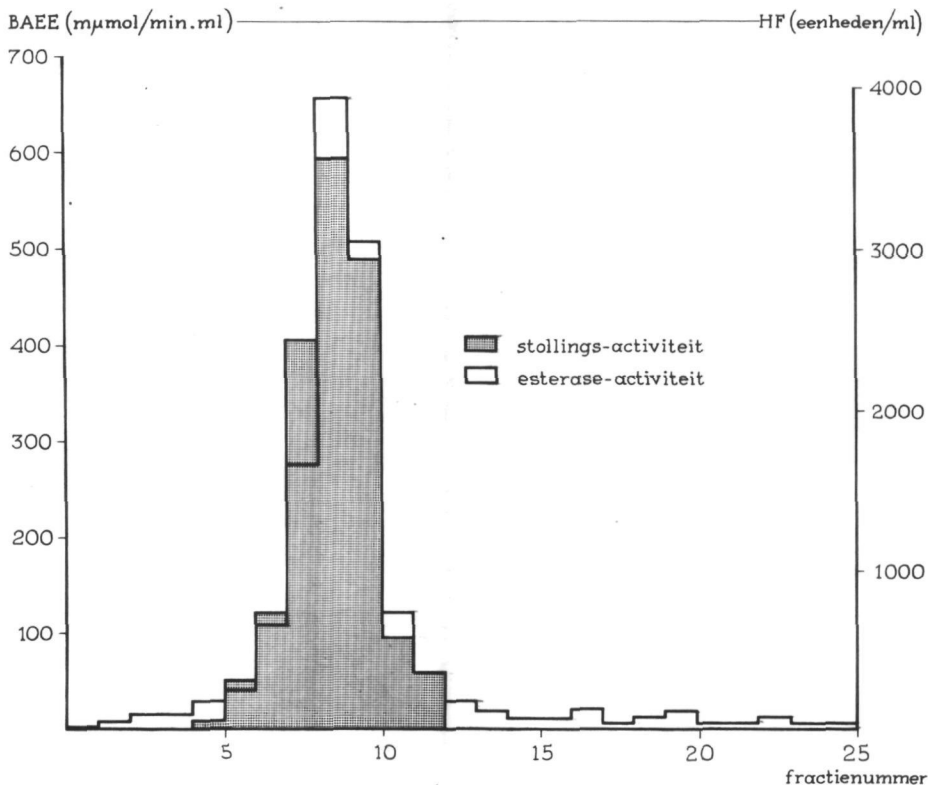
Figuur 9: Sephadex kolom-elektroforese van de Hageman factor volgens de methode van Porath¹¹⁵ en Gelotte c.s.¹¹⁶

Afmetingen van de kolomvulling 56 x 2 cm. Kolomvulling: Sephadex G 25 Fine in 0,075 M triethylamine-bicarbonaat buffer pH 7,4. De omstandigheden tijdens de elektroforese waren: 480 V; 40 mA; 8,5 uur. Temperatuur 0-20°C. Het begin van de elutie is met de linker pijl, de opbrengplaats met de rechter pijl aangegeven. Fractievolume 2 ml. — UV-absorptie bij 254 m μ ; -o----o- esterase activiteit; \square esterase activiteit/E280m μ .

Op grond van deze experimenten hebben wij geconcludeerd dat onze preparaten voldeden aan de eisen welke hieraan voor chemische en enzymatische analyses gesteld moeten worden.

4.5 DE HAGEMAN FACTOR EN DE ESTERASE ACTIVITEIT

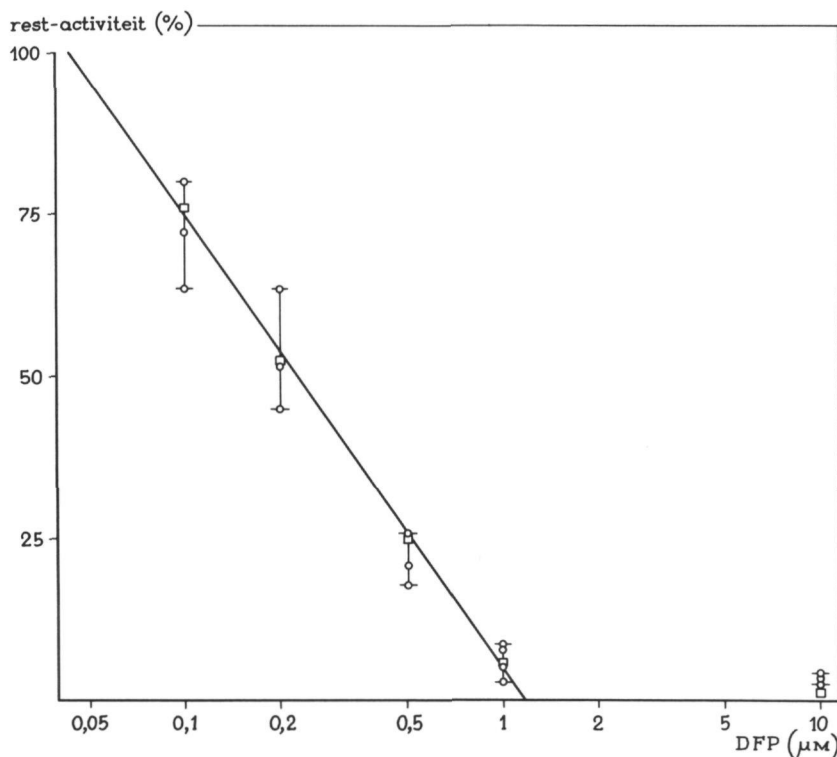
De conclusie dat de Hageman factor een esterase zou zijn, was gezien de fundamentele betekenis welke hieraan was verbonden, te indirect verkregen en mocht ons inziens niet volledig gebaseerd worden op bovengenoemde waarnemingen ten aanzien van de zuiverheid. Onafhankelijk hiervan zijn experimenten verricht welke deze conclusie bevestigen.



Figuur 10a: Verdeling van de esterase en stollingsactiviteit na "macro" polyacrylamide-gel elektroforese¹¹³. Gelsegmenten van 1,5 mm werden gehomogeniseerd in 0,15 M NaCl en aangevuld tot 1,5 ml. Na intermitterend schudden gedurende 2 uur bij 4°C werd het gel afgecentrifugeerd en de bovenstaande vloeistof getest op esterase en stollingsactiviteit, zoals beschreven is onder 3.3 en 3.2.

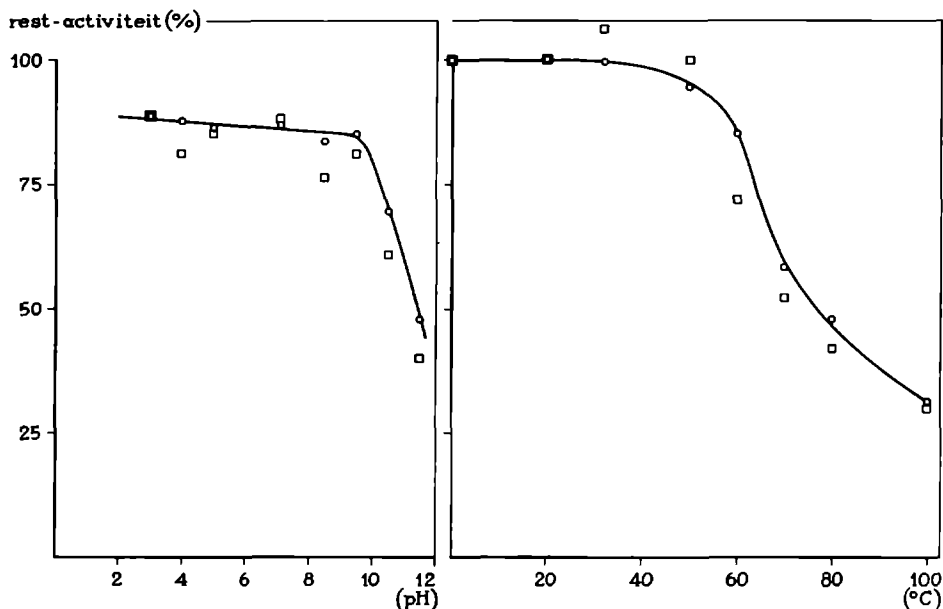


Figuur 10b: Polyacrylamide-gel elektroforese van HF op macroschaal. Cylinderafmetingen: 80 x 12 mm. Elektroforese: 8,5 uur; 10 mA; 80-90 V/cm. Temperatuur 4°C. Kleuring: amidozwart. Hoeveelheid opgebracht eiwit 1,2 mg.



Figuur 11: Invloed van DFP op de esterase en stollingsactiviteit van de Hageman factor

Een HF oplossing (0,6 ml; eiwitgehalte 0,50 mg/ml) in 0,025 M Tris-HCl buffer (pH 8,5) werd met 0,3 ml DFP van verschillende concentraties 40 min bij 37°C gepreïncubeerd. De esterase activiteit werd gemeten, zoals beschreven is onder 3.3. De stollingsactiviteit werd bepaald na voorafgaande verdunning van het mengsel tot 1 : 33 met Owren's buffer, op de manier beschreven onder 3.2. Stollingsactiviteit —○— ; —□— esterase activiteit.



Figuur 12: Invloed van de pH op de stabiliteit van de Hageman factor

Een HF oplossing (0,5 ml) werd met 0,5 ml buffer van verschillende pH gedurende 15 min bij 50°C geïncubeerd. Na afkoeling in ijs werd 0,3 ml gebruikt voor de bepaling van de esterase activiteit en 0,1 ml na verdunning tot 1 : 10 in Owren's buffer voor de bepaling van de stollingsactiviteit, resp. beschreven onder 3.3 en 3.2. De esterase activiteit (794 μ mol BAEE/min per ml) van de onbehandelde HF oplossing is als 100% aangenomen. De buffer oplossing bestond uit een 0,05 M azijnzuur- NaH_2PO_4 -Tris-glycine oplossing, die met HCl of NaOH op de gewenste pH werd gebracht. ○—○ esterase activiteit; □ stollingsactiviteit.

Figuur 13: Invloed van temperatuur op de stabiliteit van de Hageman factor

Een HF oplossing in 0,05 M Tris-HCl buffer pH 7,5 werd gedurende 15 min bij verschillende temperatuur geïncubeerd. Na afkoeling in ijs werd 0,3 ml oplossing gebruikt voor de bepaling van de esterase activiteit volgens 3.3 en 0,1 ml werd gebruikt na verdunning 1 : 20 in Owren's buffer voor de bepaling van de stollingsactiviteit volgens 3.2. De activiteit van de onbehandelde HF oplossing (esterase activiteit van 1050 μ mol BAEE/min per ml) is als 100% aangenomen. ○—○ esterase activiteit; □ stollingsactiviteit.

Een Hageman factor preparaat werd aan een "macro" polyacrylamide elektroforese onderworpen, onder identieke omstandigheden als waaronder de disc-techniek¹¹³ toegepast werd. De ene helft van de gel werd vervolgens gekleurd met amidozwart, de andere helft in segmenten van 1 à 1,5 mm verdeeld en gehomogeniseerd in 0,15 M NaCl. De extracten van deze segmenten vertoonden eenzelfde verdeling zowel in esterase- als stollingsactiviteit: zie figuur 10a en b. Als tweede argument gold

het resultaat verkregen met de esteraseremmer diisopropylfluorofosfaat (DFP), welke in staat bleek zowel de esterase- als stollingsactiviteit in gelijke mate te beïnvloeden. De resultaten, weergegeven in figuur 11, konden alleen verklaard worden, indien aangenomen werd dat de Hageman factor zelf een esterase was.

Tot slot zij nog vermeld dat voor beide activiteiten eenzelfde gedrag tegenover extreme pH invloeden en verhoogde temperatuur werd waargenomen (figuur 12 en 13). Dat de esterase activiteit inherent is aan het Hageman factor molecule, is hiermee duidelijk aangetoond. De in beide figuren weergegeven resultaten demonstreren een bijzonder grote stabiliteit van het enzym en behoeven geen nadere toelichting.

4.6 CONCLUSIE EN SAMENVATTING

Samenvattend mogen wij concluderen dat wij er door middel van bovengenoemde isolatiemethode in geslaagd zijn de Hageman factor uit runderplasma te isoleren. Op grond van de enzymatische gedragingen mogen wij concluderen dat de Hageman factor een hydrolase is, met name een esterase welke in staat is de hydrolyse van gesubstitueerde arginine esters te katalyseren.

HOOFDSTUK V

ENZYMATISCHE EIGENSCHAPPEN VAN DE HAGEMAN FACTOR

5.1 INLEIDING

Het feit dat de Hageman factor uit runderplasma de hydrolyse van L-arginine esters met een gesubstitueerde α -aminogroep katalyseert, deed de vraag rijzen of deze factor mogelijk een proteolytisch enzym is met een esterase activiteit. Een dergelijke combinatie van eigenschappen was reeds lang van trypsine en chymotrypsine bekend en is sindsdien voor vele andere proteolytische enzymen aangetoond. Sinds de waarneming van Jansen en Balls¹²⁰ dat genoemde proteolytische enzymen bovendien door DFP zijn te remmen, is het inzicht in het werkingsmechanisme van deze DFP-gevoelige enzymen sterk gegroeid. Omdat de Hageman factor eveneens door DFP geremd kan worden (zie 4.5), is een analoog werkingsmechanisme te verwachten. Behoudens een beknopte toelichting op de functionele groepen in het actieve centrum zal geen uitgebreide beschrijving van het werkingsmechanisme gegeven worden wordt verwezen naar de monografieën van Koshland¹²¹, Oosterbaan¹²² en Bender¹²³.

Behalve bij de Hageman factor is ook bij enkele andere stollingsfactoren een esterase activiteit vastgesteld; van sommige is bovendien een proteolytische werking in de stolling aangetoond en omschreven. Daarnaast zijn in het proces van de fibrinolyse en de kininevorming enkele specifieke enzymen betrokken die eveneens een esterase- en/of proteasewerking bezitten. Opmerkelijk hierbij is dat deze enzymen - met name trombine, plasmine, kallikreïne, factor Xa en PTA - één eigenschap met de Hageman factor gemeen hebben, te weten hun esterase activiteit voor BAEE en TAME.

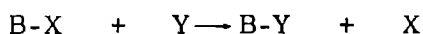
Om de Hageman factor nader te karakteriseren en zo mogelijk van bovengenoemde enzymen te onderscheiden, werden zijn esterase eigenschappen bestudeerd. Daarnaast is tevens getracht zijn proteolytische eigenschappen vast te stellen, waarbij o.a. gebruik gemaakt werd van polypeptiden met bekende aminozuurvolgorde.

5.2 ACTIEF CENTRUM

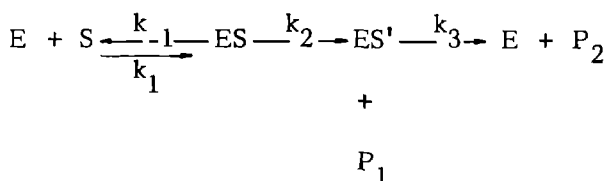
Onder het actieve centrum van een hydrolytisch enzym wordt dat gedeelte verstaan waar het substraat gebonden, geactiveerd en gehydro-

lyseerd wordt. Uit het feit dat denaturatie meestal gepaard gaat met vernietiging van de enzymactiviteit, doch anderzijds vaak gedeelten van een enzym zonder schade kunnen worden afgesplitst, weten wij dat niet het volledige eiwitmolecule, maar wel een bepaalde ruimtelijke configuratie daarvan bij de enzymatische reactie is betrokken. Deze configuratie, die rechtstreeks bij de binding van het substraat aan het enzym betrokken is, is echter geen star geheel, zoals in het klassieke beeld van Fischer wordt verondersteld, maar vertoont een bepaalde mate van flexibiliteit, zodat het substraat een oriëntatieverandering in het actieve centrum kan induceren die leidt tot een juiste positie van de katalytische groepen¹²¹.

De door proteasen en esterasen gekatalyseerde reacties zijn transferreacties en kunnen als volgt weergegeven worden:

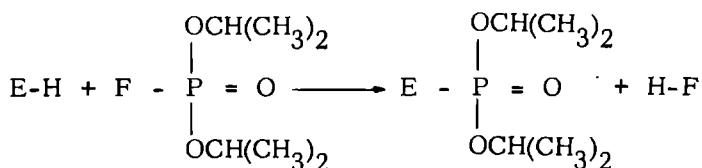


Hierbij stelt B-X het substraat (met donor X) en Y de acceptorgroep voor, die bij hydrolyse door het H₂O molecule wordt ingenomen. Kinetische en spectrofotometrische metingen aan chymotrypsine¹²³⁻¹²⁵ en trypsine¹²⁶ hebben duidelijk aangetoond dat de hydrolyse van een substraat (b.v. een ester) verloopt volgens een z.g. "double displacement" reactie. Hierbij wordt groep B onder afsplitsing van X eerst overgedragen op het enzym en daarna vindt pas een overdracht plaats op de acceptor Y. In de gebruikelijke termen van de enzymkinetiek kan deze hydrolyse als volgt worden weergegeven:



Hierbij bestaat de eerste stap uit de (snelle) vorming van een Michaelis-Mentencomplex ES, gevolgd door een overdrachtsreactie, waarbij een acyl-enzym ES' en P₁ (b.v. de alcohol) ontstaat. Tenslotte vindt een de-acyleringsreactie plaats, waarbij de acylgroep aan het watermolecule wordt overgedragen en het betreffende zuur P₂ wordt gevormd. Het bestaan van een dergelijk acyl-intermediair is voor het eerst door Hartley en Kilby¹²⁴ bij chymotrypsine aangetoond en later bevestigd door de isolatie van acyl-intermediären van velerlei structuren¹²³.

Een zeer stabiel intermediair komt voor bij die esterasen en proteasen welke in hun enzymatische werking geremd kunnen worden door DFP of analoge orthofosforzuurverbindingen. De reactie van DFP met het enzym kan als volgt schematisch worden weergegeven:



Het diisopropylfosforyl-enzym is echter zó stabiël in vergelijking met een acyl-enzym dat men van een irreversibele remmingsreactie moet spreken. Door milde hydrolyse van de met ^{32}P -DFP geremde enzymen zijn fosforylpeptiden verkregen, waarbij de gemerkte fosforylgroep steeds aan een serineresidu gebonden was. De structuur van deze fosforylpeptiden is voor een reeks onderzochte DFP-gevoelige enzymen weergegeven in tabel 10. De conclusie dat de hydroxylgroep van het serinemolecule in het actieve centrum de rol vervult van acceptor voor de acylgroep in de enzymatische esterhydrolyse, is hiermee zeer waarschijnlijk geworden.

Behalve aan het serinemolecule wordt tevens aan een histidinemolecule in het actieve centrum een belangrijke rol toegeschreven voor de enzymatische werking van deze groep DFP-gevoelige hydrolasen. Vele waarnemingen hebben tot deze conclusie geleid, waarvan de belangrijkste zijn:

- De pH-activiteitscurven van deze enzymen vertonen een beeld waaruit blijkt dat een ioniseerbare groep met een pK-waarde van 6-7 betrokken is bij de hydrolyse. Deze groep zou de imidazol van histidine moeten zijn.
- Imidazol en histidine vertonen de eigenschap als nucleofiel agens de niet-enzymatische hydrolyse van bepaalde esters te versnellen.
- De vernietiging van een of meer histidineresiduen in het enzym door foto-oxydatie of dinitrofenyltering veroorzaakt een overeenkomstig verlies in de enzymactiviteit.

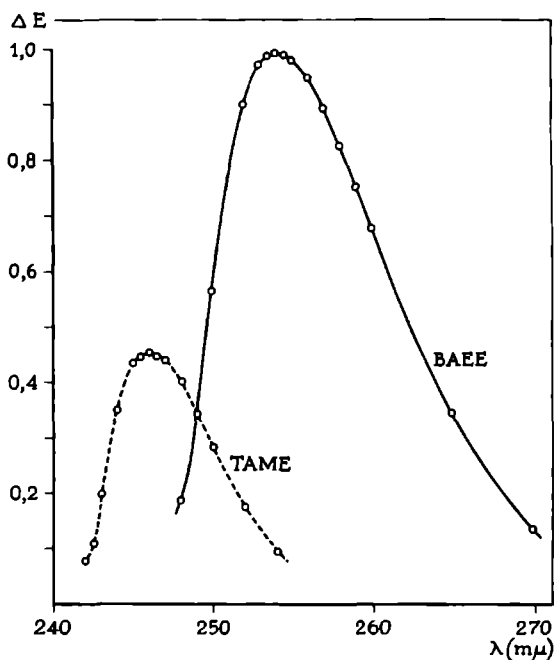
Een direct bewijs voor de belangrijkheid van histidine in het actieve centrum is door Shoellman en Shaw¹²⁷ geleverd voor chymotrypsine met het substraatverwante alkyleringsmiddel 1-broom-3-(N-tosyl)amino-4-fenyl-butanon-2.

Hoewel serine en histidine bij vele DFP-gevoelige enzymen als katalytisch werkzame aminozuren zijn geïdentificeerd, zijn zij alleen niet voldoende om de specificiteit van het enzym te verklaren. Deze wordt namelijk volledig bepaald door de onderlinge ruimtelijke ligging van de verschillende ketens, die ieder door hun nucleofiele, elektrofile en specifieke bouwstenen bijdragen tot de werkzaamheid van het actieve centrum.

Bij het onderzoek naar de kinetische eigenschappen van de Hageman factor werd gebruik gemaakt van de differentiaalspectrofotometrische methode volgens Schwert en Takenaka¹⁰³, welke reeds bij de bepaling van de esterase activiteit van de Hageman factor, beschreven onder 3.3, is toegepast. Bij experimenten welke niet langs spectrofotometrische weg waren te verwezenlijken, werd een titrimetrische methode¹³¹ toegepast.

5.3.1 Spectrofotometrische methode

Volgens Schwert en Takenaka¹⁰³ bestaat er in het ultraviolette gebied een verschil in lichtabsorptie tussen de geïoniseerde en niet-geïoniseerde carboxylgroep van α -N-benzoyl-arginine. Omdat in esters geen geïoniseerde carboxylgroep aanwezig is, kan van dit absorptieverschil gebruik gemaakt worden om de hydrolyse van α -N-benzoyl-arginine esters spectrofotometrisch te volgen. Het verschilspectrum is weergegeven in figuur 14. De oplossingen bevatten respectievelijk 0,001 M BAEE in 0,10 M Tris-HCl buffer (pH 8,5) en 0,001 M BA in de-



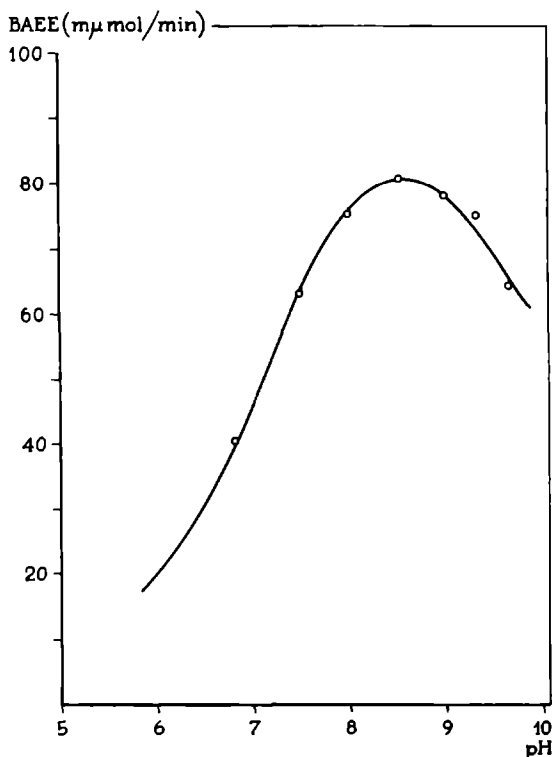
Figuur 14: Verschilspectrum van BAEE-BA en TAME-TA bij pH 8,5
Het verschilspectrum is gemeten tussen oplossingen van 1 mM ester (BAEE of TAME) in 0,1 M Tris-HCl buffer (pH 8,5) en 1 mM zuur (BA of TA) in dezelfde buffer. Optische lichtweg 1 cm; bandbreedte 1,2 m μ .

zelfde buffer. Het maximale verschil in absorptie wordt waargenomen bij 254 m μ bij een gekozen bandbreedte van 1,2 m μ . Het verschil in molaire extinctiecoëfficiënt bedraagt 990, hetgeen iets lager is dan door bovengenoemde auteurs is bepaald. Op analoge wijze (fig.14) wordt voor het TAME-TA systeem een differentie-absorptiemaximum gevonden bij 246 m μ . Het verschil in molaire extinctiecoëfficiënt bedraagt 460.

Voor de uitvoering van de spectrofotometrische methode wordt verwezen naar 3.2.2.

5.3.2 Titrimetrische methode

Dezemethode werd toegepast in die gevallen, waar de spectrofotometrische methode moeilijk uitvoerbaar was. De snelheid van esterhydrolyse werd potentiometrisch gevolgd met een pH-stat, bestaande uit een autotitrator (type Radiometer, Copenhagen, TTT-1a) en een recorder.



Figuur 15: pH-optimumcurve van de Hageman factor

Een HF oplossing (0,3 ml) werd toegevoegd aan 3,0 ml substraatoplossing in Trisbuffers van verschillende pH en de reactie werd daarna gedurende 5 min bij 37°C spectrofotometrisch gevolgd. De substraatoplossing bevatte per ml: 1 μ mol BAEE en 100 μ mol Tris-HCl buffer.

De laatste registreerde het alkaliverbruik van een microburet als functie van de tijd. Zowel recorder als microburet werden door middel van een magnetisch relais in de autotitrator bekrachtigd, indien de pH in de meetcel afweek van de ingestelde pH-waarde.

De meetcel, voorzien van een micro-glaselektrode (type Radiometer G 2222), micro-calomelelektrode, magneetroerder en toevoercapillair van de microburet, werd op 37°C gehouden. Alle metingen werden uitgevoerd onder een stikstofstroom, die met waterdamp van dezelfde temperatuur verzadigd was. De alkali die voor de titraties gebruikt werd, bestond uit een vers bereide, gestelde 0,01 N NaOH oplossing. De metingen werden als volgt uitgevoerd:

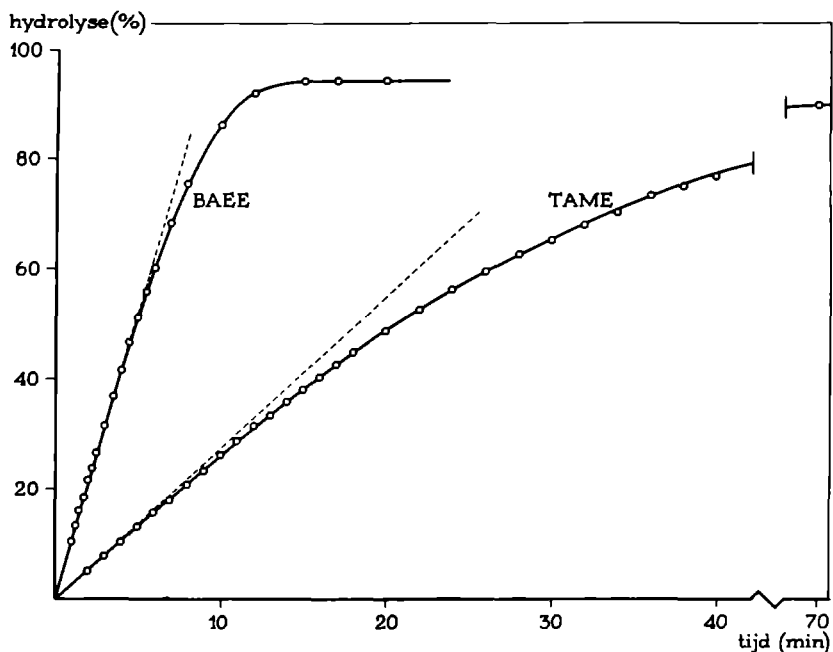
In de meetcel werd 3,0 ml substraatoplossing gepipetteerd, ditmaal bestaande uit 0,01 M BAEE in 0,1 M NaCl, gevolgd door 0,3 ml enzymoplossing. Onmiddellijk hierna werd zoveel verdunde NaOH toegevoegd dat de pH in de meetcel gelijk was aan de op de autotitrator ingestelde pH-waarde, waarna de recorder gestart werd en de hydrolyse gedurende 20 minuten werd geregistreerd. Iedere enzymatische hydrolyse - in duplo uitgevoerd - werd gecorrigeerd voor spontane hydrolyse.

5.4 INVLOED VAN DE pH OP DE ESTERASE ACTIVITEIT

Wanneer de Hageman factor werd geïncubeerd met BAEE als substraat bij verschillende pH-waarden, werd, zoals uit figuur 15 blijkt, een optimale esterase activiteit waargenomen bij pH 8,5. Als substraat werd gebruikt een 1 mM BAEE oplossing in 0,1 M Tris-HCl buffer. De buffers werden met een pH-meter (Polymetron, Type 42 B) gesteld bij 37°C.

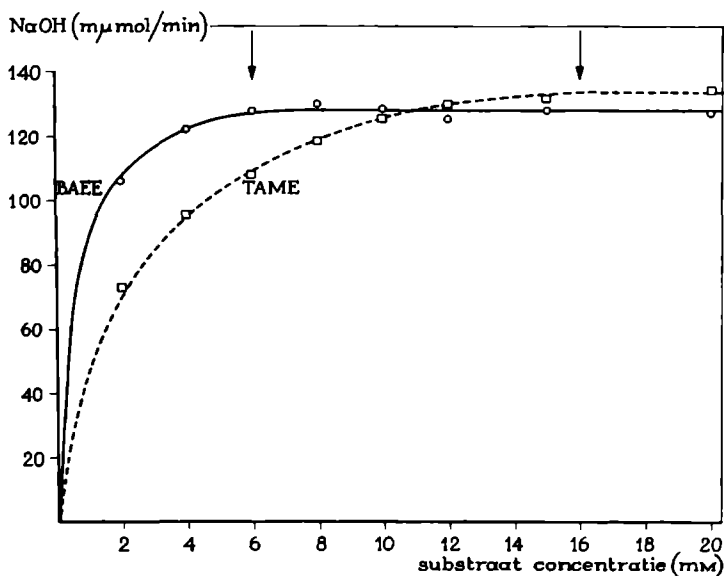
5.5 INVLOED VAN SUBSTRAAT- EN ENZYMCONCENTRATIE

Bij een oriënterend onderzoek werd vastgesteld dat de Hageman factor in staat is zowel BAEE als TAME te hydrolyseren. Het verloop van de hydrolyse als functie van de incubatietijd is voor beide esters weergegeven in figuur 16. De bereikte eindwaarden in extinctie geven aan dat van de esters BAEE en TAME resp. 94% en 90% gehydrolyseerd wordt. Het niet-lineaire verloop van de TAME hydrolyse werd niet veroorzaakt door produktremming, maar was een gevolg van de vermindering in substraatconcentratie, zoals bij een reactie van de eerste orde verwacht kan worden. Werde de hydrolysesnelheid van TAME gemeten als functie van de substraatconcentratie, dan werd een reactie van de nulde orde pas bereikt bij een beginconcentratie van 16 mM TAME. Voor BAEE daarentegen lag deze waarde, zoals blijkt uit figuur 17, aanmerkelijk lager en wel bij 6 mM. Het is opmerkelijk dat de Hageman factor beide esters met vrijwel gelijke snelheid hydrolyseert, indien aan de voor-



Figuur 16: Verloop van de hydrolyse van BAEE en TAME als functie van de tijd. Een HF oplossing (0,3 ml) werd toegevoegd aan 3,0 ml substraatoplossing en de reactie bij 37°C spectrofotometrisch gevolgd. De substraatoplossing bevatte per ml: 1 μ mol BAEE of TAME en 100 μ mol Tris-HCl buffer pH 8,5.

waarde van optimale substraatconcentratie is voldaan. De enzymen trombine^{53,139}, trypsine¹⁴⁰ en PTA⁴⁴ daarentegen hydrolyseren TAME aanzienlijk sneller dan BAEE. De gevonden verhouding in de hydrolysesnelheid TAME/BAEE bedraagt voor trombine 2,1-2,3, voor trypsine 5,2-5,6 en voor het PTA zelfs 7,8, in tegenstelling tot een verhouding van ca. 1,1 voor de Hageman factor. Bij de spectrofotometrische methode voor de bepaling van de esterase activiteit van de Hageman factor preparaten werd gebruik gemaakt van een beginconcentratie van 1 mM substraat, hetgeen betekent dat niet onder optimale omstandigheden werd gemeten. Het meten met hogere substraatconcentraties was echter spectrofotometrisch moeilijk uitvoerbaar door de grote zelfabsorptie van deze esters. Uit figuur 16 blijkt dat de hydrolyse van BAEE bij een beginconcentratie van 1 mM met constante snelheid verloopt, indien niet meer dan 40% van deze ester is omgezet, zodat de beginsnelheid van de reactie in dit geval direct gemeten kon worden. Met TAME als substraat kon daarentegen de aanvangssnelheid slechts langs grafische weg bepaald worden. Mede hierdoor is de spectrofotometrische



Figuur 17: De snelheid van de esterase activiteit voor BAEE en TAME als functie van de substraatconcentratie

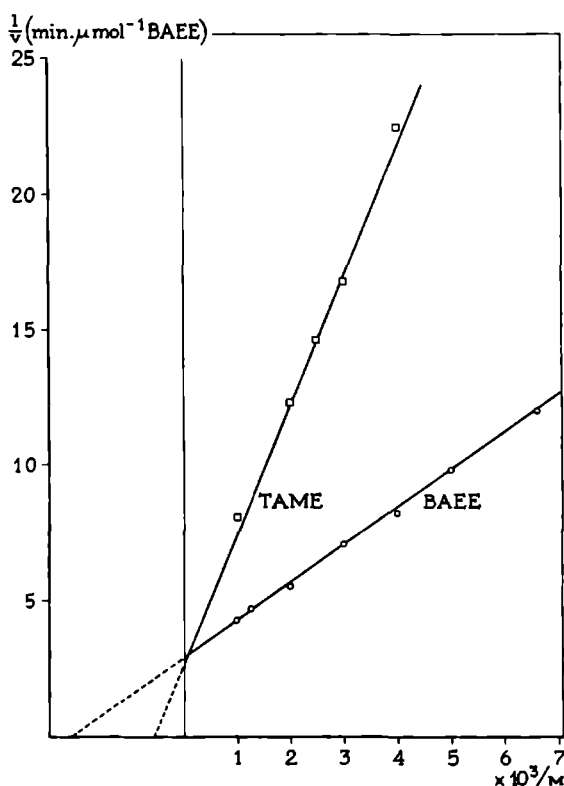
Een HF oplossing (0,3 ml) werd toegevoegd aan 3,0 ml substraat oplossing en de reactie gedurende 20 min bij 37°C en pH 8,5 titrimetrisch gevolgd. De substraat-oplossing bevatte 100 μmol NaCl per ml en BAEE of TAME in aangegeven concentraties.

methode voor de bepaling van HF activiteiten met TAME als substraat minder geschikt.

Werden de beginsnelheden van de reactie gemeten als functie van de substraatconcentratie en grafisch uitgezet volgens de methode van Lineweaver-Burk¹⁴¹, dan werden de rechten verkregen zoals die in figuur 18 zijn weergegeven. De hieruit geëxtrapoleerde K_m waarden waren $1,6 \times 10^{-3}$ M TAME en $4,7 \times 10^{-4}$ M BAEE. De maximale snelheden bedroegen $11,4 \mu\text{mol TAME} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ eiwit en $10,7 \mu\text{mol BAEE} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ eiwit.

Werden de beginsnelheden van de reactie gemeten als functie van de enzymconcentratie bij een constante substraatconcentratie van 1 mM BAEE, dan werd een lineair verband verkregen zoals dat is weergegeven in figuur 19 a en b. Van dit lineair verband is gebruik gemaakt bij de bepaling van de Hageman factor activiteit, zoals beschreven onder 3.3. De reproduceerbaarheid van deze bepaling is weergegeven in tabel 11. De bovengenoemde metingen zijn uitgevoerd in afwezigheid van Ca^{++} -ionen. De invloed van deze kationen op enkele proteolytische enzymen is bekend. Zo verhinderen Ca^{++} -ionen o.a. de aggregatie van

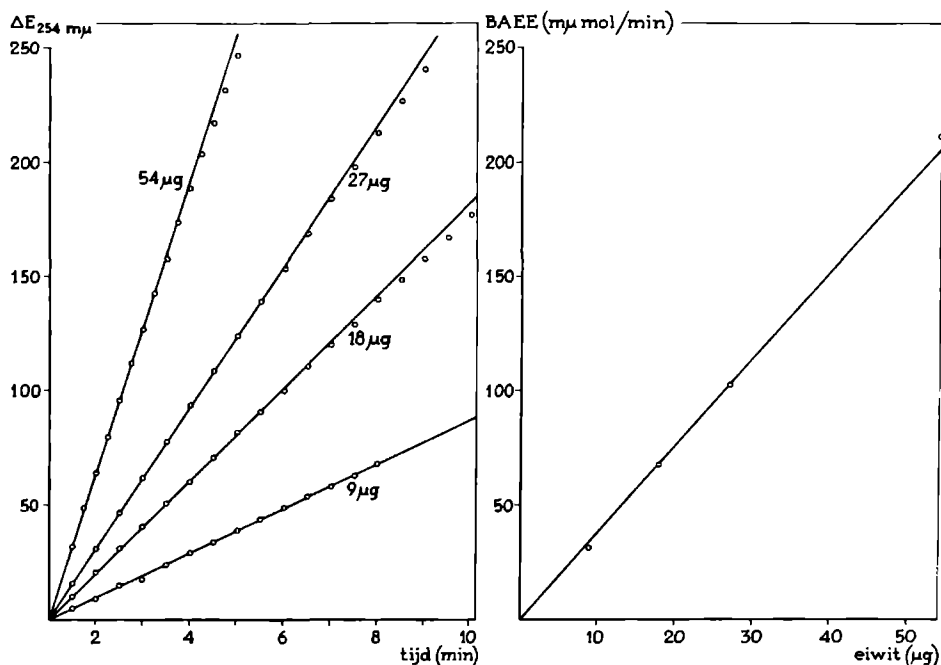
trypsine¹⁴² en autolyse van chymotrypsine, trypsine¹⁴², subtilisine^{143*)} en factor V¹⁴⁴ door een stabiliserende invloed op de natieve vorm van deze enzymen. Deze stabiliserende invloed is tevens een mogelijke verklaring voor de verhoogde activiteit van chymotrypsine en trypsine in aanwezigheid van calciumionen¹⁴⁵. De esterase activiteit van de Hageman factor wordt echter niet beïnvloed door Ca^{++} -ionen (tabel 12); deze ionen werden daarom niet aan het incubatiemedium toegevoegd.



Figuur 18: Bepaling van de Michaelis-Menten constante (K_m) van de esterase reactie voor BAEE en TAME

Een HF oplossing (0,3 ml; 0,104 mg eiwit/ml) werd toegevoegd aan 3,0 ml substraatoplossing en de reactie gedurende 5 min bij 37°C spectrofotometrisch gevolgd. De substraatoplossing bevatte per ml: BAEE of TAME in verschillende concentraties en 100 μmol Tris-HCl buffer pH 8,5. De beginsnelheid werd langs grafische weg bepaald. K_m TAME = $1,6 \times 10^{-3}$ M; K_m BAEE = $4,7 \times 10^{-4}$ M.

*) *Bacillus subtilis* protease, stam N'.



Figuur 19a: Toename in extinctie bij 254 mμ als functie van de tijd bij verschillende HF concentraties

Aan een HF oplossing (0,05-0,3 ml), aangevuld met water tot 0,3 ml, werd 3,0 ml substraatoplossing toegevoegd en de verandering in extinctie bij 37°C gemeten. De substraatoplossing bevatte per ml: 1 μmol BAEE en 100 μmol Tris-HCl buffer pH 8,5. De hoeveelheid HF per test is in de figuur aangegeven.

Figuur 19b: De hydrolysesnelheid van BAEE als functie van de Hageman factor concentratie

De in figuur 19a verkregen $\Delta E/\text{min}$ werd omgezet in $\mu\text{mol BAEE}/\text{min}$ door deling met het transformatiegetal 0,30 (zie 3.3.2).

5.6 INVLOED VAN DE IONENSTERKTE

De esterase activiteit van de Hageman factor met BAEE als substraat bleek afhankelijk te zijn van de ionensterkte. De invloed van verschillende concentraties NaCl op de hydrolysesnelheid van BAEE is weergegeven in figuur 20. Door Scheraga¹⁴⁶ en onlangs door Curragh en Elmore¹³⁹ is een soortgelijke invloed vastgesteld van NaCl en KCl op de TAME esterase activiteit van trombine. Bij trypsine heeft daarentegen de ionensterkte geen invloed op de hydrolysesnelheid van zowel TAME als BAEE¹⁴⁰.

TABEL 11

Reproduceerbaarheid van de BAEE-esterase activiteit
bij verschillende Hageman factor concentraties

HF-oplossing toegevoegd (ml)	Esterase activiteit (μ mol BAEE/min)			
	0,3	0,2	0,1	0,05
	350	241	129	59
	355	244	124	63
	342	237	131	67
	347	234	129	58
	359	241	123	62
	351	245	132	64
Gemiddeld	351	240	128	62
SD *)	5,5	3,9	3,3	3,0
SD (%)	1,6	1,6	2,6	5

De esterase activiteit werd gemeten zoals beschreven onder 3.3.2 aan een gedeeltelijk gezuiverd Hageman factor preparaat met een eiwitgehalte van 1,54 mg/ml.

*) Standaard deviatie: Deze is op analoge wijze berekend als in tabel 5 is aangegeven.

Een toename in de hydrolysesnelheid van BAEE bij toenemende ionensterkte is waargenomen o.a. voor papaine¹⁴⁷ en voor het enzym ficine¹⁴⁷. Ook bij de bepaling van de stollingsactiviteit van de Hageman factor konden wij een afhankelijkheid van de ionensterkte waarnemen⁹⁸. In het stollingsmechanisme zijn echter ook andere reacties afhankelijk van de heersende ionenconcentratie, zodat de waargenomen afhankelijkheid bij de HF-stollingstest mede door andere reacties in het stollingsproces bepaald wordt.

5.7 HYDROLYSE VAN ANDERE SUBSTRATEN

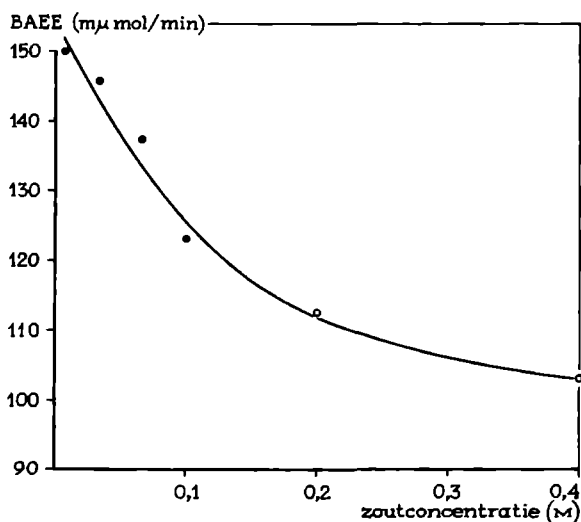
Teneinde de substraatspecificiteit van de Hageman factor nader te analyseren, werden verschillende esters onderzocht. Een eventuele hydrolyse werd daarbij titrimetrisch bepaald. Als substraatoplossing werd

TABEL 12

Invloed van Ca^{++} en EDTA op de hydrolysesnelheid van BAEE
door de Hageman factor

Toegevoegd	Eindconcentratie	m μ mol BAEE/min
0	-	145
Ca^{++}	5 μ mol/ml	142
Ca^{++}	10 μ mol/ml	134
EDTA	3,3 μ mol/ml	140
EDTA	6,7 μ mol/ml	143

Een HF oplossing (0,3 ml) werd toegevoegd aan 3,0 ml substraatoplossing en de reactie gedurende 5 min bij 37°C spectrofotometrisch gevolgd. De substraatoplossing bevatte per ml: 1 μ mol BAEE, 100 μ mol Tris-HCl buffer pH 8,5 en Ca^{++} of EDTA in genoemde concentraties. Eiwitconcentratie HF oplossing: 0,29 mg/ml.



Figuur 20: De invloed van de ionensterkte op de esterase activiteit van de Hageman factor

Een HF oplossing (0,3 ml) werd toegevoegd aan 3,0 ml substraatoplossing en de reactie gedurende 5 min bij 37°C spectrofotometrisch gevolgd. De substraatoplossing bevatte per ml: 1 μ mol BAEE en resp. 6,7, 33, 67 en 100 μ mol Tris-HCl buffer pH 8,5 (●) of 100 μ mol Tris-HCl buffer pH 8,5 en resp. 100 en 300 μ mol NaCl (○). Eiwitconcentratie HF oplossing 0,322 mg/ml.

T A B E L 13

Hydrolyse van esters en amides door de Hageman factor

	Begincon- centratie mM	Hydrolyse μmol NaOH/min	Enzym-Act. μmol BAEE/min	Methode
1 p-tosyl-L-arginine methylester	10	323	348	T
2 L-lysine methylester	10	14	290	T
3 N-acetyl-L-tyrosine ethylester	10	0	348	T
4 N-acetyl-L-phenylalanine ethylester	10	44	348	T
5 N-acetyl-L-valine methylester	10	8	348	T
6 N-benzoylglycine methylester	10	0	290	T
7 DL-alanine ethylester	10	0	290	T
8 N-benzoyl-DL-alanine methylester	1	0	290	T
9 N-benzoyl-DL-arginine β-naftylamide	1,1	0	182	S ⁽¹⁵⁷⁾
10 N-benzoyl-DL-arginine p-nitroanilide	0,6	0	176	S ⁽¹⁵⁸⁾

Een HF oplossing (0,3 ml) werd toegevoegd aan 3,0 ml substraatoplossing en de reactie gedurende 40 min bij 37°C titrimetrisch gevolgd. De substraten waren opgelost in 0,1 M NaCl. Het toegevoegde enzym vertoonde een esterase activiteit t.a.v. BAEE zoals is aangegeven. T: titrimetrisch, S: spectrofotometrisch.

genomen 10 mM ester in 0,1 M NaCl, die bij de pH-waarden van 6,5 tot en met 9,0 met de Hageman factor werden geïncubeerd. Zoals uit tabel 13 blijkt, werd met uitzondering van BAEE en TAME geen van de onderzochte esters onder deze omstandigheden noemenswaardig gesplitst. De enzymconcentratie welke bij deze experimenten werd gebruikt was zodanig dat een hydrolysesnelheid van slechts 5%, vergeleken met de overeenkomstige snelheid van de BAEE hydrolyse, nog goed aantoonbaar was.

Het β-naftylamide en het p-nitro-anilide van N-benzoyl-DL-arginine worden niet gesplitst, hetgeen wijst op een ontbreken van een amidase activiteit van de Hageman factor. Bij vele proteolytische enzymen, zoals trypsine, chymotrypsine, leucine aminopeptidase evenals bij vele proteasen uit bacteriën en planten gaat een esterase activiteit gepaard met een duidelijke amidase activiteit. In andere gevallen echter, zoals bij plasmine¹⁴⁸, kallikreïne*) en trombine⁵³ wordt wel esterase activiteit

*) Persoonlijke mededeling van Dr. G.E. Davies naar aanleiding van het uit serum van cavia's geïsoleerde kallikreïne⁹¹.

voor BAEE maar geen amidase activiteit voor het overeenkomstige amide waargenomen.

Dat de Hageman factor een specifieke esterase - doch geen aantoonbare amidase activiteit bezit, sluit een mogelijke verontreiniging uit met een enzym met amidase activiteit.

5.8 REMMERS

Op grond van de invloed welke bepaalde remmers of activators op de enzymatische activiteit van proteasen uitoefenen, is het mogelijk deze enzymen in enkele groepen te verdelen.

Tot de eerste groep kunnen die proteasen gerekend worden waarvan de activiteit afhankelijk is van één of meer thiolgroepen en die derhalve geremd kunnen worden door reagentia welke op de thiolgroep inwerken, zoals zware metalen en hun derivaten (pCMB), alkyleringsmiddelen en oxydatiemiddelen. Karakteristiek voor deze groep zijn te noemen papaine, ficine, enkele kathepsinen evenals enkele andere proteasen uit bacteriën en planten.

Een tweede groep wordt gevormd door die proteasen waarvan de activiteit afhankelijk is van metaalionen, zoals Mg^{++} , Mn^{++} , Co^{++} , Zn^{++} en Fe^{++} , welke meer of minder sterk aan het enzym zijn gebonden. Remmers voor deze groep enzymen, waarvan leucine-aminopeptidase en enkele dipeptidasen de belangrijkste zijn, zijn vooral de complexvormende verbindingen zoals EDTA alsmede bepaalde metaal-vergiften.

Een derde groep wordt gevormd door proteasen welke geremd worden door DFP en overeenkomstige organofosforverbindingen. Deze enzymen, waartoe onder meer trypsine, chymotrypsine, trombine, subtilisine behoren, worden echter niet geremd door reagentia op thiolgroepen. Omgekeerd zijn de SH-groep afhankelijke enzymen niet te remmen door DFP. Daarentegen wordt in het algemeen wel een remming door metaalionen geconstateerd, veroorzaakt door complexvorming met de imidazolgroep in het actieve centrum.

Om na te gaan tot welke groep de Hageman factor behoort werd een aantal bekende inhibitoren en metaalionen getest.

De invloed van metaalionen op de BAEE-hydrolyse door de Hageman factor is samengevat in tabel 14. De verkregen resultaten tonen aan dat de esterase activiteit van de Hageman factor sterk afhankelijk is van metaalionen. Opvallend is het effect van Zn^{++} - en Ni^{++} - en gedeeltelijk ook van Cd^{++} -ionen, die sterker remmen dan Hg^{++} - en Cu^{++} -ionen. De remming veroorzaakt door Zn^{++} -, Ni^{++} - en Cd^{++} -ionen bleek reversibel te zijn. Toevoeging van EDTA gaf zo goed als volledig herstel van de esterase activiteit te zien.

De invloed van een tweede reeks mogelijke remmers is weergegeven in tabel 15. Hierbij werd het enzym eerst gedurende 5-30 min gepre-

T A B E L 14

Remming van de esterase activiteit van Hageman factor
door metaalionen

Metaalion toegevoegd	% remming	
	10 ⁻³ M	10 ⁻⁴ M
Ca 2+	0	0
Mg 2+	0	0
Mn 2+	4	0
Cu 2+	-	10
Hg 2+	74	15
Co 2+	79	17
Cd 2+	62	28
Ni 2+	91	44
Zn 2+	98	55

Een HF oplossing (0,2 ml) werd met het metaalion (0,1 ml) in 2,0 ml Tris-HCl buffer pH 8,5 gedurende 10 min gepreïncubeerd, vervolgens werd 1,0 ml substraat-oplossing toegevoegd en de reactie gedurende 5 min bij 37°C spectrofotometrisch gevolgd. Het reactiemengsel bevatte per ml: 1 of 0,1 µmol metaalion (alle sulfaten, behalve HgCl₂, CaCl₂ en Pb(NO₃)₂), 100 µmol Tris-HCl buffer pH 8,5 en 1 µmol BAEE. In afwezigheid van metaalionen (100%) werd 198 µmol BAEE/min omgezet.

incubeerd met de remmer bij 37°C, waarna BAEE als substraat werd toegevoegd en de hydrolysesnelheid spectrofotometrisch gemeten. De resultaten laten zien dat alléén LBTI en DFP een remmende invloed uitoefenen op de esterase activiteit van de Hageman factor. Omdat pCMB en monojoodazijnzuur onder deze omstandigheden geen remming veroorzaken, is een SH-afhankelijkheid van de katalytische werkzaamheid van de Hageman factor onwaarschijnlijk. ε-Aminocapronzuur, een remmer voor o.a. plasmine¹⁴⁹ en trypsine¹⁵⁰, is eveneens zonder invloed. Trasylol, een door Kraut, Werle en Frey beschreven kallikreïneremmer uit runderparotis¹⁵¹, is eveneens in staat trypsine¹⁵², chymotrypsine¹⁵² en plasmine¹⁵³ te remmen. Op de Hageman factor kon echter geen remmende invloed van dit polypeptide aangetoond worden, zelfs niet onder omstandigheden die gunstig zijn voor competitieve remming. Evenmin kon een remmende invloed van SBTI op de Hageman factor activiteit worden vastgesteld, zelfs niet, wanneer de substraatconcentratie 10-voudig werd

T A B E L 15

Invloed van enkele remmers op de esterase activiteit
van de Hageman factor

Toegevoegde remmer	Toegevoegde hoeveelheid	Pre-incubatie (min)	Esterase-activiteit μmol BAEE/min	Rest-activiteit (%)	
ovomucoïd	1000 μg	15	146	102	S
SBTI	1000 μg	15	139	97	S
LBTI	1000 μg	15	29	20	S
LBTI	500 μg	15	54	31	S
joodazijnzuur	3,3 μmol	15	150	104	S
pCMB	1 μmol	5	196	98	T
DFP	1 μmol	30	0	0	S
ϵ -ACA	30 μmol	10	143	102	S
trasylol	400 E	5	140	100	S
heparine	2 mg	5	140	100	S
indolpropion- zuur	2 μmol	5	178	97	T
indol	2 μmol	5	204	107	T

Een HF oplossing (0,2 ml) werd met 0,1 ml oplossing van een remmer of 0,1 ml H_2O gedurende een bepaalde tijd gepreïncubeerd, vervolgens werd 3,0 ml substraatoplossing toegevoegd en de reactie gedurende 5 min bij 37°C spectrofotometrisch of gedurende 30 min bij 37°C titrimetrisch gevolgd. De substraatoplossing bevatte per ml: 1 μmol BAEE, 100 μmol Tris-HCl buffer pH 8,5 bij de spectrofotometrische (S) of 10 μmol BAEE en 100 μmol NaCl bij de titrimetrische methode (T). De esterase activiteit zonder remmer toevoeging is 100% gesteld.

verlaagd. Wanneer in aanmerking wordt genomen dat SBTI daarentegen wel in staat is vele andere BAEE-hydrolyserende enzymen te remmen, met name trypsine, plasmine, trombokinase of factor Xa, plasmakallikreïne evenals het kinine E vormend enzym ("KFS") van Armstrong en Mills¹⁵⁴, dan pleiten deze resultaten duidelijk voor het eigen karakter van de Hageman factor.

Behalve bovengenoemde werden eveneens enkele uit serum geïsoleerde

T A B E L 16

Invloed van enkele protease-remmers uit serum
op de esterase activiteit van de Hageman factor

Toegevoegde remmer	Toegevoegde hoeveelheid (μg)	Esterase activiteit $\text{m}\mu\text{mol}$ BAEE/min	Rest- activiteit %
geen	-	135	100
α_1 -antitrypsine	500	138	102
α_1 -antichymotrypsine	500	149	110
inter- α -trypsin inhibitor	500	151	112
α_2 -macroglobuline *)	800	132	98

Een HF oplossing (0,2 ml; 26 μg eiwit) werd met de remmer (0,1 ml) gedurende 15 min bij 37°C geïncubeerd; vervolgens werd 3,0 ml substraatoplossing toegevoegd en de reactie gedurende 5 min bij 37°C spectrofotometrisch gevolgd. De substraatoplossing bevatte per ml: 1 μmol BAEE en 100 μmol Tris-HCl buffer pH 8,5.

*) α_2 -macroglobuline is een trypsine- en plasmineregger. Voor nadere bijzonderheden van deze groep remmers wordt verwezen naar ref.137.

remmers onderzocht*). (zie tabel 16) Ofschoon trypsine en chymotrypsine sterk werden geremd, kon ook met deze verbindingen geen remming op HF worden waargenomen. Van de trypsineregger met polypeptide-structuur bleek alleen LBTI een duidelijk merkbare remming te veroorzaken. Zoals uit tabel 17 blijkt is de hoeveelheid materiaal, nodig om de Hageman factor te remmen relatief hoog, hetgeen wijst op een geringe affiniteit tussen enzym en inhibitor.

Van grotere betekenis voor het inzicht in het reactiemechanisme van de Hageman factor is de waarneming dat de esterase activiteit van dit enzym is te remmen door DFP. Reeds eerder hebben Becker⁸⁰ en Ratnoff c.s.³⁴ een remming geconstateerd van DFP op de stollingsactiviteit van Hageman factor preparaten van menselijke oorsprong, maar Ratnoff en Davie³⁵ konden dit effect aan verder gezuiverde preparaten niet bevestigen. Omdat DFP is op te vatten als een pseudosubstraat, dat bij proteasen en esterases met serine in het actieve centrum aanleiding

*) Deze polypeptiden werden ons toegezonden door bemiddeling van Dr.G.Schwick, Behringwerke A.G., Marburg a/d Lahn, waarvoor wij gaarne onze dank uitspreken.

TABEL 17

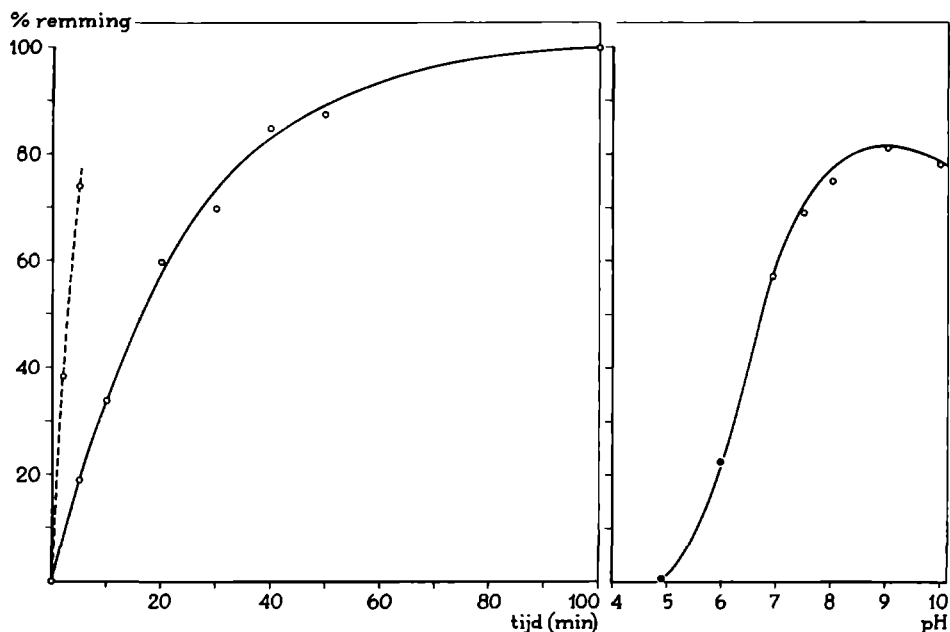
Remming van de esterase activiteit van de Hageman factor door LBTI

Remmers in μg	Esterase activiteit $\text{m}\mu\text{mol}/\text{min}$ per ml enzym	Rest-activiteit in %
0	560	100
50	414	74
100	348	62
250	252	45
500	168	30

Een oplossing van de Hageman factor (0,2 ml; 18 μg eiwit) werd gepreïncubeerd gedurende 10 min bij 37°C met 0,1 ml LBTI (Limabean trypsin inhibitor) van verschillende concentraties; vervolgens werd 3,0 ml substraatoplossing toegevoegd en de reactie gedurende 5 min bij 37°C spectrofotometrisch gevolgd. De substraatoplossing bevatte per ml: 1 μmol BAEE, 100 μmol Tris-HCl buffer pH 8,5.

geeft tot de vorming van een stabiel fosforyl-enzymintermediair, zal de remming door DFP afhankelijk zijn van die factoren welke eveneens van invloed zijn op de proteolytische of esterolytische reactie.

Indien de Hageman factor met DFP bij pH 8,5 geïncubeerd werd, bleek de mate van remming afhankelijk te zijn van de incubatietijd. Bij een DFP concentratie van $3,3 \times 10^{-4}$ M werd een volledige remming bereikt na 100 minuten (figuur 21). Dat DFP inderdaad het actieve centrum blokkeert, kon worden bevestigd door de volgende waarnemingen. Indien de Hageman factor geïncubeerd werd met DFP bij verschillende pH-waarden, dan bleek de mate van remming pH afhankelijk te zijn (figuur 22). Het beeld van de gemeten curve is te beschouwen als het spiegelbeeld van de normale pH-afhankelijkheidscurve van de hydrolysereactie (figuur 15). Beide curven vertonen nagenoeg hetzelfde pH-optimum 8,5. Als tweede argument geldt de waarneming dat het substraat een beschermende invloed uitoefent op het enzym bij de remming van DFP. Zoals blijkt uit de resultaten in tabel 18, treedt een duidelijke remming op wanneer de Hageman factor en DFP worden gepreïncubeerd in afwezigheid van het substraat en wel des te meer naarmate de preïncubatietijd groter is. Deze remming blijft echter achterwege, indien het substraat reeds aanwezig is, voordat DFP wordt toegevoegd. De verklaring hiervoor ligt in het feit dat het substraat het serineresidu in het actieve centrum heeft geacyleerd en zodoende het actieve centrum van het enzym beschermt tegen een irreversibele reactie met DFP.



Figuur 21: DFP remming van de Hageman factor als functie van de incubatietijd. Een HF oplossing (0,6 ml; 122 μg eiwit) werd met een gebufferde DFP oplossing (1,2 ml) bij 25°C geïncubeerd. Na de aangegeven tijd van incubatie werd 0,3 ml mengsel aan 3,0 ml substraatoplossing toegevoegd en de reactie gedurende 5 min bij 37°C spectrofotometrisch gevolgd. Het incubatiemengsel bevatte per ml: 0,33 μmol DFP en 50 μmol Tris-HCl buffer pH 8,5. -----: 10 x grotere DFP concentratie.

Figuur 22: pH-afhankelijkheid van de DFP remming

Een HF oplossing (0,1 ml; 44 μg eiwit) werd met een gebufferde DFP oplossing (0,2 ml) geïncubeerd gedurende 30 min bij 37°C. Daarna werd aan het incubatiemengsel 3,0 ml substraatoplossing toegevoegd en de reactie gedurende 5 min bij 37°C spectrofotometrisch gevolgd. De substraatoplossing bevatte per ml: 1 μmol BAEE en 100 μmol Tris-HCl buffer pH 8,5. Het incubatiemengsel bevatte per ml: 0,33 μmol DFP, 50 μmol Tris-HCl (○) of 50 μmol $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ buffer (●).

De remming van de Hageman factor door DFP bleek noncompetitief te zijn. Blijkens de resultaten, welke grafisch zijn weergegeven in figuur 23, heeft incubatie van de Hageman factor met DFP wel een verandering in de maximale reactiesnelheid tot gevolg, maar blijft de K_m waarde onveranderd. De affiniteitsconstante K_i tussen enzym en remmer werd langs grafische weg bepaald volgens de methode van Dixon¹⁵⁵ en bedraagt 10^{-4} M DFP.

TABEL 18

Remming door DFP met en zonder aanwezigheid van substraat

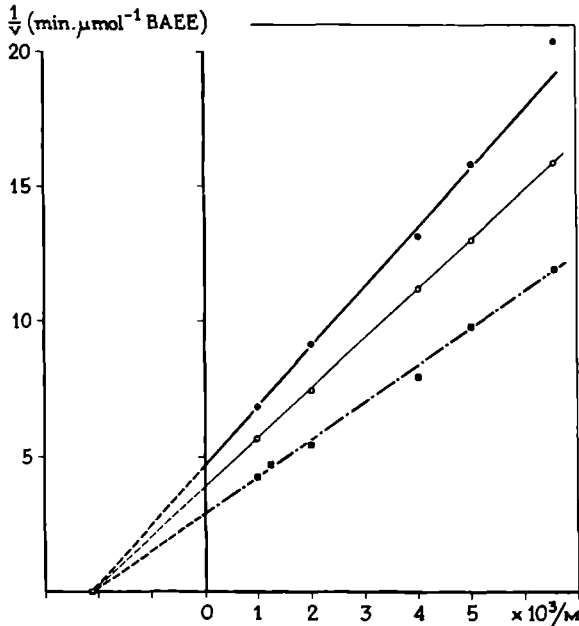
	Incubatiemengsel	Incubatie- tijd (min)	Na incubatie toegevoegd	Esterase activiteit $\mu\text{mol/min}$	Remming %
A	0,2 ml HF + 0,1 ml H ₂ O	0	3 ml BAEE	146	0
B	0,2 ml HF + 3,0 ml BAEE	2	0,1 ml DFP	143,5	2
		5	0,1 ml DFP	142	3
C	0,2 ml HF + 0,1 ml DFP (10^{-2}M)	2	3 ml BAEE	30	38
		5	3 ml BAEE	38	74

Aan een HF oplossing in Tris-HCl buffer pH 8,5 (0,2 ml) werd onder C) 0,1 ml DFP, onder B) 3,0 ml BAEE toegevoegd. Na een incubatietijd van 2 of 5 min bij 37°C werd onder C) 3,0 ml BAEE onder B) 0,1 ml DFP toegevoegd en de reactie gedurende 5 min bij 37°C spectrofotometrisch gevolgd. Het reactiemengsel bevatte per ml: $1\mu\text{mol}$ BAEE, $0,3\mu\text{mol}$ DFP en $105\mu\text{mol}$ Tris-HCl buffer pH 8,5. Toegevoegde hoeveelheid HF per test: $20,5\mu\text{g}$.

5.9 REVERSIBELE ENZYM INACTIVERING

Tijdens oriënterende experimenten kon worden waargenomen dat behandeling van de Hageman factor met enkele karakteristieke reagentia als dodecylsulfaat, guanidine hydrochloride en ureum een sterke vermindering van de esterase activiteit tot gevolg had. Het inactiverende effect van deze reagentia op enzymen is een algemeen voorkomend verschijnsel en berust, wat dodecylsulfaat betreft, op een openleggen van de meer apolaire, inwendige structuur van het eiwit door een penetratie van de apolaire staart van het detergens. Ureum en guanidine hydrochloride zijn o.a. in staat de waterstofbruggen tussen de peptideketens te verbreken, waardoor eveneens veranderingen in de ruimtelijke structuur van het enzym worden teweeggebracht. Heeft deze overgang naar de gedenatureerde toestand tevens een verandering van het actieve

centrum tot gevolg dan is het reagens voor de enzymatische eigenschappen letaal.

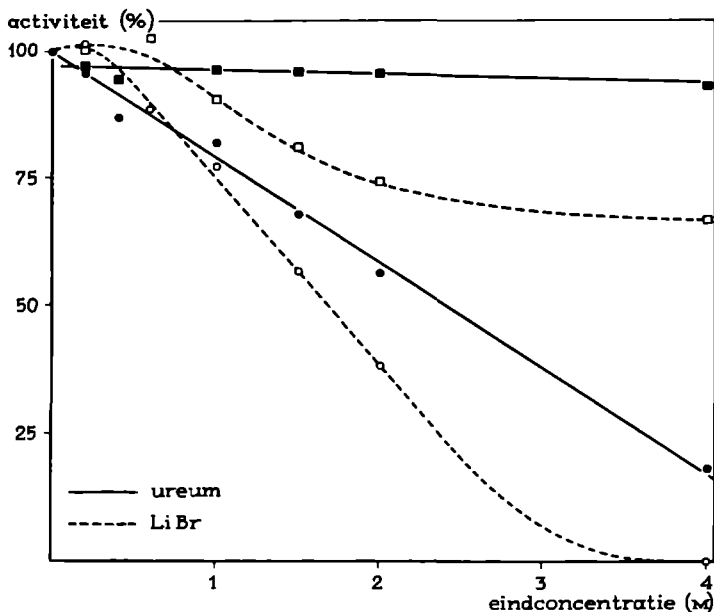


Figuur 23: Non-competitieve remming van de Hageman factor door DFP bij pH 8,5. Een HF oplossing (0,2 ml; 264 μg eiwit) werd met verschillende hoeveelheden DFP (0,1 ml) geïncubeerd gedurende 30 min bij 37°C. Daarna werd 3,0 ml substraatoplossing toegevoegd en de reactie 5 min bij 37°C spectrofotometrisch gevolgd. De substraatoplossing bevatte 100 μmol Tris-HCl buffer pH 8,5 per ml en BAEE in concentraties, zoals aangegeven. Toegevoegde hoeveelheden DFP: 0,01 μmol (○—○); 0,02 μmol (●—●); geen DFP toegevoegd (■---■).

Omdat eiwitten, wanneer deze aan vast-vloeistof grensvlakken zijn geadsorbeerd, vaak ontrold of zelfs gedenatureerd zijn, wordt de activering van de Hageman factor door een activerend oppervlak beschouwd als een zodanige ontrolling van het eiwitmolecule dat er sprake is van enzymatische activiteit (zie hoofdstuk II). Om deze postulering te onderzoeken, hebben wij getracht veranderingen in de tertiaire structuur van het HF molecule te induceren en de esterase eigenschappen daarbij te volgen.

De Hageman factor werd gedurende 15 minuten met verschillende concentraties ureum voorbehandeld en vervolgens werd na toevoeging van een oplossing van BAEE in ureum de esterase activiteit gemeten. Het verloop van deze activiteit als functie van de ureumconcentratie is weergegeven in figuur 24. Indien de preïncubatietijd tot 30 minuten werd

verlengd, bleef de mate van inactivering constant, zodat deze vermoedelijk een snel verlopend proces is.



Figuur 24: Reversibele inactivering van de Hageman factor door ureum of LiBr. Een HF oplossing (0,1 ml; 24 μ g eiwit) werd bij pH 8,5 en 37°C geïncubeerd met een oplossing (0,2 ml) van ureum of LiBr van verschillende concentraties. De inactivering werd gemeten na een incubatietijd van 15 of 30 min door 3,0 ml substraat-ureum of substraat-LiBr oplossing toe te voegen en de reactie gedurende 5 min bij 37°C spectrofotometrisch te volgen. —●— ureum; --□-- LiBr. Het incubatiemengsel bevatte 100 μ mol Tris-HCl buffer pH 8,5 per ml en ureum of LiBr in de aangegeven concentraties. De substraat-ureum resp. substraat-LiBr oplossing bevatte per ml: 1 μ mol BAEE en 100 μ mol Tris-HCl buffer pH 8,5 en ureum of LiBr in gelijke concentraties als het incubatiemengsel. De reactivering werd gemeten door het bovengenoemde incubatiemengsel te verdunnen met Tris-HCl buffer pH 8,5 (2 ml; 300 μ mol). Na resp. 15 of 30 min herstellijd werd 1 ml BAEE (3 μ mol) toegevoegd en de reactie 5 min bij 37°C spectrofotometrisch gevolgd. Reactivering in ureum —■— ; in LiBr --□--.

Werd het preïncubatiemengsel, bestaande uit de Hageman factor in ureum na 15 minuten denaturatie, achtvoudig verdund, dan bleek een volledig herstel op te treden van de esterase activiteit en wel binnen 15 minuten (zie figuur 24), zodat geconcludeerd mag worden dat herstel van de oorspronkelijke configuratie eveneens een snel verlopend proces is. Zowel bij de inactivering als bij de herstelfase werd, met uitzondering van de oorspronkelijke configuratie, geen andere toestand waarge-

nomen die overeenkomst vertoont met die, welke bij (of direct ná) glas-adsorptie van de Hageman factor verondersteld zou kunnen worden.

Gezien het inactiverende effect dat ureum op de Hageman factor uitoefent, werd eveneens de invloed van LiBr nader onderzocht. Harrington en Shellmann¹⁵⁶ hebben aan LiBr een waterstofbrugbevorderend effect toegeschreven en het is derhalve een "contra-denaturerend" agens. Onder analoge experimentele omstandigheden als bij ureum werd toegepast, bleek LiBr eveneens een inactivering van de Hageman factor te veroorzaken. Het verloop van deze inactivering, welke na 30 minuten was bereikt, is als functie van de LiBr-concentratie weergegeven in figuur 24. Ook hier bleek na 8-voudige verdunning een herstel van de activiteit op te treden, die na een hersteltijd van 15 minuten niet volledig was. Verlenging tot 30 minuten gaf een gunstiger beeld, doch volledig herstel werd niet bereikt.

Dat de Hageman factor zowel door ureum als door LiBr wordt geïnactiveerd, zonder dat een duidelijk actieve toestand hieraan voorafgaat, zou kunnen wijzen op het reeds bestaan van een zodanige configuratie van het molecule dat activering - althans op deze wijze - niet meer mogelijk is. Opmerkelijk is dat de overgang van gedeneerde in natieve toestand een reversibel proces is.

5.10 PROTEOLYTISCHE EIGENSCHAPPEN VAN DE HAGEMAN FACTOR

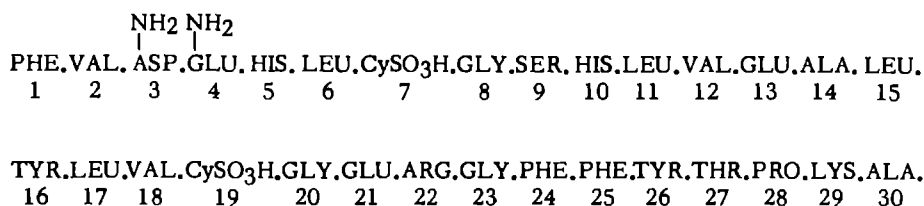
Hoewel de esterase eigenschappen van de Hageman factor vastgesteld zijn en de enzymkinetische parameters ervan zijn beschreven, is de vraag of de Hageman factor een protease is, nog niet beantwoord. Om het proteolytische karakter van een enzym aan te tonen, maakt men meestal gebruik van eiwitsubstraten, zoals caseïne, gedeneerd hemoglobine, albumine e.d. Een andere mogelijkheid is, gebruik te maken van polypeptiden waarvan de aminozuurvolgorde bekend is. Deze door ons toegepaste methodiek heeft als voordeel dat tevens kan worden vastgesteld welke peptidebindingen specifiek door het te onderzoeken enzym gesplitst worden.

Bij ons onderzoek hebben wij gebruik gemaakt van de zuivere polypeptiden ACTH en de B-keten van geoxydeerd insuline*). Rest ons nog te vermelden dat als leidraad bij de structuuropheldering van de afzonderlijke peptidebrokstukken de uitstekende monografie van Bailey¹⁵⁹ werd geraadpleegd, benevens enkele artikelen van Ingram¹⁶⁰ en Sanger c.s.¹⁶¹.

*) Het ACTH (β -corticotropin) en de B-keten van insuline werden ons toegezonden door bemiddeling van Dr. J. D. H. Homan, N. V. Organon, Oss, waarvoor wij onze erkentelijkheid betuigen.

5.10.1 B-keten van insuline

Als eerste polypeptide werd de phenylalanyl-(B)-keten van geoxydeerd insuline gebruikt, dat uit runderinsuline was verkregen. De aminozuurvolgorde van dit polypeptide is weergegeven in figuur 25. De toegepaste werkwijze bestond uit drie gedeelten. Eerst werd een enzymatische hydrolyse op kleine schaal uitgevoerd om vast te stellen of proteolyse had plaatsgevonden, vervolgens werd een hydrolyse op grotere schaal uitgevoerd, waarna de afzonderlijke brokstukken werden gescheiden en hun aminozuursamenstelling werd bepaald.



Figuur 25: Aminozuurvolgorde van de phenylalanyl-(B)-keten van geoxydeerd runderinsuline

5.10.1.1 Hydrolyse op kleine schaal

Een hoeveelheid - 1 mg B-keten insuline - opgelost in 1 ml 0,1 M NH₄-acetaat buffer pH 8,5, werd met de Hageman factor geïncubeerd bij 37°C. Na resp. 4, 8, 16 en 24 uur werd 0,2 ml monster hiervan genomen en deze werden samen met de intacte B-keten aan een elektroforese bij hoog voltage onderworpen. De omstandigheden hiervoor waren: Whatman-papier no.3; buffersysteem I (zie voor de gebruikte codering tabel 19); 1400 V; 35 V/cm; + 50 mA; 90 minuten.

Reeds na 4 uur hydrolyse werd, behalve de nog ongesplitste B-keten op de opbrengplaats, een duidelijke band waargenomen, die zich 4 cm naar de kathode verplaatst had. Na 16 uur en 24 uur was geen ongesplitst polypeptide meer aanwezig; een nieuwe band, slechts 1 cm in de richting van de kathode was hiervoor in de plaats gekomen, terwijl de reeds genoemde band intensiever was geworden.

5.10.1.2 Hydrolyse op grotere schaal

Een grotere hoeveelheid - 6,0 mg B-keten - werd in een titratiecel van de autotitrator (Radiometer TTT, 1-a) gebracht. Hieraan werd 3 ml water toegevoegd en de pH van de troebele oplossing met 0,01 N NaOH langzaam op pH 8,5 ingesteld. Bij deze pH was de oplossing helder. Na toevoeging van de Hageman factor tot een enzym-substraat

TABEL 19

Systeem	Samenstelling	Verhouding (v/v)
I	pyridine-ijsazijn-water	100 : 10 : 890 pH = 6,5
II	pyridine-ijsazijn-water	10 : 100 : 890 pH = 3,5
III	mierenzuur-ijsazijn-water	150 : 100 : 750 pH = 2,0
IV	n-butanol-ijsazijn-water- pyridine	30 : 6 : 24 : 20
V	n-butanol-ijsazijn-water	3 : 1 : 1
VI	sec.butanol-methylethylketon- dicyclohexylamine-water	10 : 10 : 2 : 5
VII	tolueen-pyridine-chloorethanol- 0,8 N ammonia	10 : 3 : 3 : 6.
VIII	chloroform-benzylalcohol- ijsazijn	70 : 30 : 3
IX	n-propanol-gec.ammonia	7 : 3

verhouding van 1 : 25 werd de proteolyse gedurende 18 uur bij pH 8,5 en 37°C titrimetrisch gevolgd. Nadien werd het hydrolysaat gelyofiliseerd en verder geanalyseerd.

5.10.1.3 Scheiding en identificatie van de brokstukken

Een bevredigende scheiding van de brokstukken werd verkregen door een papierelektroforese bij pH 2,0 uit te voeren. De elektroforetische omstandigheden waren: Whatmanpapier no.3; buffersysteem III; 1500 V; 43 V/cm; + 60 mA; 120 minuten. Na drogen werden smalle stroken van het elektroferogram met enkele specifieke aminozuurreagentia*) bespoten en ontwikkeld. In totaal waren 4 ninhydrine-positieve banden zichtbaar, waarvan de gegevens zijn vermeld in tabel 20.

*) De toegepaste specifieke aminozuurreagentia zijn:

Het ninhydrine-collidine-reagens.

Het Sakaguchi-reagens voor Arg.

Het Pauly-reagens voor His en Tyr.

Het Ehrlich-reagens voor Try.

Het α -nitroso- β -naftol-reagens voor Tyr.

Voor nadere bijzonderheden wordt verwezen naar de monografie van Bailey¹⁵⁹.

T A B E L 20

Peptiden verkregen door hydrolyse van de B-keten van insuline met de Hageman factor

Peptide nummer	Afstand tot de opbrengplaats	Intensiteit met ninhydrine	Aanwezige spec. aminozuren **)
1	-11,2 cm	++	-
2	- 8,1 cm	+++	tyr
3	- 7,0 cm	+	-
4	- 4,0 cm	++++	arg, his
ala*)	-11,4 cm		

*) Het ala is als referentie-aminozuur opgebracht.

**) Als aminozuurreagentia zijn slechts het Sakaguchi- en het Paulyreagens gebruikt.

Het vermoeden dat peptide no.1 uit alanine zou bestaan, kon papierchromatografisch bevestigd worden. Na chromatografie in systeem IV was slechts één vlek zichtbaar met een R_f van 0,29, welke identiek was aan de R_f van ala, dat als referentie gebruikt was. Peptide no.2 werd 16 uur in 6N HCl bij 108-112°C in een dichtgesmolten buis gehydrolyseerd. Ter identificatie van de aminozuren werd tweedimensionale papierchromatografie uitgevoerd, waarvan de omstandigheden waren: Whatmanpapier no.1; eerste richting dalend in systeem V; 16 uur bij 23°C; tweede richting stijgend in systeem VI; 9-10 uur bij 23°C. De volgende aminozuren konden in peptide no.2 met zekerheid worden vastgesteld: lys, ala, pro, thr, gly, en phe. Peptide no.3 en 4 werden niet nader op aminozuursamenstelling onderzocht. Wel werd een hydrolysaat van de B-keten van insuline, bereid met HF, papierelektroforetisch (pH 2,0) vergeleken met een overeenkomstig hydrolysaat, bereid met trypsine. Dit laatste vertoonde drie banden, te weten een snel lopende band, afkomstig van ala, de middelste band afkomstig van peptide brokstuk 23-29 (zie figuur 25) en een langzaam lopende band, afkomstig van peptide 1-22. Peptide no.4 van het HF-hydrolysaat en deze band 1-22 vertoonden een gelijke elektroforetische beweeglijkheid. Omdat beide bovendien arginine-positief reageerden, werd geconcludeerd, dat peptide no.4 identiek is aan brokstuk 1-22.

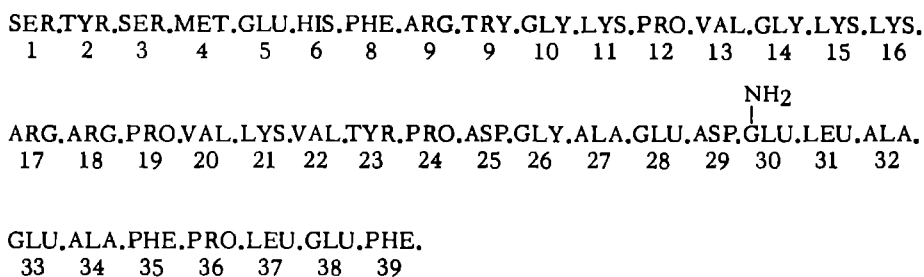
5.10.1.4 Conclusie

Bewust van de onvolledigheid van het onderzoek mogen we toch ons inziens het volgende concluderen. De Hageman factor is in staat de

B-keten van geoxydeerd (runder)insuline proteolytisch te splitsen en wel zodanig, dat de bindingen arg (22)-gly(23) en lys(29)-ala(30) worden verbroken. Peptide no.4 is vermoedelijk identiek aan peptide 1-22, peptide no.2 aan peptide 23-30 en band no.1 is alanine. Over de samenstelling van peptide no.3 is geen uitsluitsel te geven.

5.10.2 ACTH

Als tweede polypeptide werd het uit varkens geïsoleerde hormoon ACTH gebruikt. De aminozuurvolgorde van dit polypeptide is afgebeeld in figuur 26. De werkwijze voor het hydrolyseren van ACTH door de Hageman factor is analoog aan de methode die bij de B-keten van insuline is beschreven. De hydrolyse op preparatieve schaal is uitgevoerd met 8,9 mg ACTH bij pH 8,5 en 37°C in een enzym-substraatverhouding van 1 : 40. Na hydrolyse gedurende 24 uur werd het hydrolysaat gelyofiliseerd en in drie afzonderlijke porties verder verwerkt.



Figuur 26: Aminozuurvolgorde van het varkens-ACTH

5.10.2.1 Scheiding en identificatie van de brokstukken

Eengoede scheiding van de brokstukken werd verkregen door papier-elektroforese bij pH 6,5. De omstandigheden van elektroforese waren: Whatmanpapier no.3; buffersysteem I; 1500 V; 43 V/cm; 40-55 mA; 120 minuten. Na elektroforese werden weer smalle stroken van het elektroferogram bespoten en ontwikkeld met de genoemde specifieke aminozuur-reagentia. In totaal werden 9 peptidebanden waargenomen, waarvan de localisatie en de aangetoonde specifieke aminozuren in tabel 21 aangegeven zijn. Ieder brokstuk werd afzonderlijk met water geëluëerd, en verder papierchromatografisch op homogeniteit onderzocht. Ieder brokstuk werd daartoe gebracht op Whatmanpapier no.1 en gechromatografeerd in systeem IV in dalende richting gedurende 16 uur. Uitgezonderd

TABEL 21

Peptiden verkregen door hydrolyse van ACTH met de Hageman factor

Peptide nummer	Afstand tot de opbrengplaats	Intensiteit met ninhydrine	Aanwezige spec. aminozuren
H ₁	+13,3	++	arg
H ₂	+11,8	+	-
H ₃	+ 8,5	++++	try, (arg?)
H ₄	+ 3,1	++++*)	arg, his, tyr
H ₅	+ 0,5	++++	arg, try
H ₆	- 0,5	+++*)	arg
H ₇	- 1,0	++	tyr
H ₈	- 1,7	+	-
H ₉	- 3,2	(+)	-

*) Peptiden H₄ en H₆ toonden met ninhydrine-collidine een geelbruine kleur.

de chromatogrammen van de peptiden H₁, H₃ en H₄ vertoonden alle andere meer dan één peptideband; een aantal banden van verschillende peptidechromatogrammen vertoonden onderling bovendien dezelfde R_f waarde. Ofschoon getracht is van ieder chromatogram het peptide, overeenkomend met de meest intensieve ninhydrinevlek, te elueren en hiervan langs papierchromatografische weg de aminozuursamenstelling te achterhalen, heeft dit slechts voor een aantal peptiden tot positieve resultaten geleid. Ieder homogeen peptide werd gedurende 16 uur in 6 N HCl in een dicht gesmolten buis gehydrolyseerd bij 108-112°C. Vervolgens werd tweedimensionale papierchromatografie toegepast en wel eerst in dalende richting in systeem V, 16-18 uur bij 23°C en daarna in stijgende richting in systeem VI, 10 uur. De aminozuursamenstelling die op deze wijze van enkele peptiden werd verkregen, is in tabel 22 weergegeven.

5.10.2.2 Fingerprinting en bepaling van de N-eindstandige aminozuren

Om met meer zekerheid de bovengenoemde resultaten te kunnen beoordelen, werden van een ACTH-hydrolysaat, bereid met HF, de daarin aanwezige N-eindstandige aminozuren bepaald. Bovendien werd van hetzelfde hydrolysaat een reeks "fingerprints" gemaakt en deze na kleuring met de specifieke aminozuurreagentia, vergeleken met overeenkomstige trypsinehydrolysaten. Beide technieken werden uitgevoerd

T A B E L 22

Aminozuursamenstelling van enkele peptiden
verkregen door hydrolyse van ACTH met de Hageman factor

Peptide nummer	Aminozuren aangetoond	Rf-waarde in systeem IV	Vermoedelijk brokstuk
H ₁	arg	0,08	17
H ₂ B	lys, (arg?)	0,10	16,16-17
H ₃	lys, gly, pro, val	0,24	9-15,9-16
H ₄	glu, ser, his, phe, arg, met	0,42	1-8
H ₅ E	arg, lys, pro, val, ala, leu, phe, (glu?)	0,39	1-39,9-39

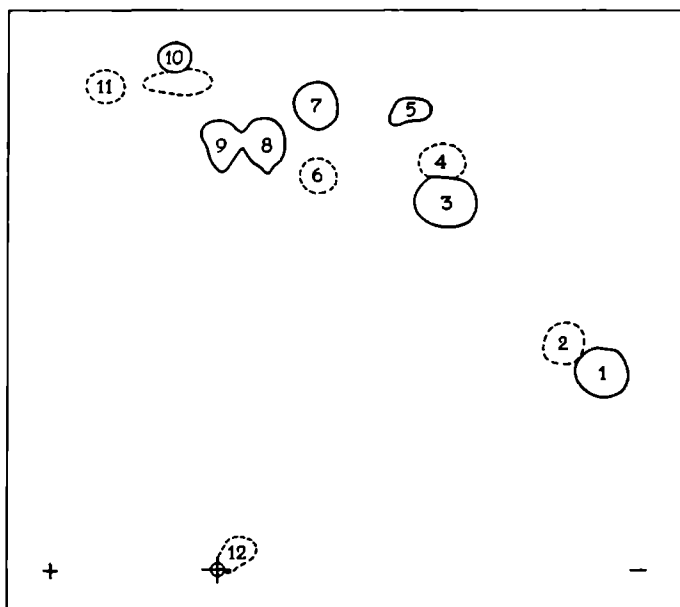
door Goverde van N.V.Organon, Oss*).

De N-eindstandige aminozuren werden bepaald volgens de DNFB-methode van Sanger. Het principe hiervan is dat men een geringe overmaat 1-fluor-2,4-dinitrobenzeen in zwak alkalisch milieu - bij constante temperatuur van 40°C en pH 8,0 door gebruikmaking van de autotitrator-op het ACTH-hydrolysaat laat inwerken. Na beëindiging van de reactie en verwijdering van de overmaat DNFB werden de DNP-peptiden gehydrolyseerd in 6N HCl gedurende 15 uur bij 105°C. De aanwezige etheroplosbare DNP-aminozuren werden geïdentificeerd door gebruikmaking van tweedimensionale dunnelaag-chromatografie volgens de methode van Niederwieser c.s.¹⁶². Omstandigheden: kiezelgel G; eerste dimensie, systeem VII van Biserte en Osteux¹⁶³; tweede dimensie, systeem VIII. Als etheroplosbare DNP-aminozuren werden ser en try aangetoond. DNP-val, DNP-gly en DNP-pro konden onder deze omstandigheden niet aangetoond worden. Van de water-oplosbare DNP-aminozuren, geïdentificeerd door dunnelaag-chromatografie volgens Niederwieser c.s.¹⁶² in systeem IX, werd slechts DNP-arg waargenomen.

De fingerprinting van het HF-hydrolysaat werd uitgevoerd volgens de methode van Ingram. Deze methode bestaat uit elektroforese in systeem II in de eerste dimensie en opstijgende chromatografie in systeem V in de tweede dimensie¹⁶⁰. De verschillende fingerprints, bespoten en ontwikkeld met de reeds aangegeven specifieke aminozuurreagentia,

*) Wij zijn Ir.B.C.Goverde en de heer F.J.M.Veenkamp, N.V.Organon, Oss, voor de uitvoering van deze experimenten en het toelichten van de resultaten veel dank verschuldigd.

gaven een beeld zoals dit in figuur 27 samengesteld is weergegeven. Op grond van deze en bovengenoemde resultaten en van vergelijkende studie met overeenkomstige hydrolysaten, bereid met trypsine, werden de verschillende peptiden geïdentificeerd en hun vermoedelijke structuur aangegeven (tabel 23).



Figuur 27: Fingerprint van het hydrolysaat van ACTH na inwerking van de Hageman factor

5.10.2.3 Conclusie

Hoewel ook hier door de vaak beperkte hoeveelheid van de ACTH-brokstukken, waarover na isolatie beschikt kon worden, een definitieve conclusie voorbarig is, mag toch gesteld worden dat het ACTH door de Hageman factor proteolytisch wordt afgebroken, waarbij een voorkeur bestaat voor het splitsen van arginyl- en lysylbindingen. De bindingen die door de Hageman factor gesplitst worden, zijn nogmaals in onderstaande figuur weergegeven (zie figuur 28).

5.10.3 Chymotrypsinogeen A

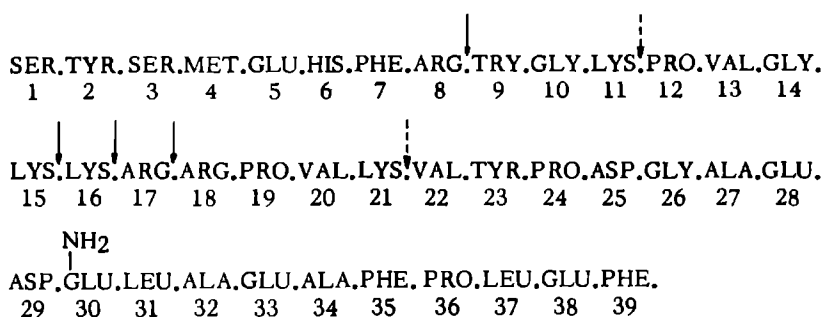
Omdat de Hageman factor als proteolytisch enzym in staat is evenals trypsine arginyl-bindingen te splitsen werd als derde substraat het chymotrypsinogeen gekozen. Bij de uitvoering van de proef werden chy-

TABEL 23

Peptiden in het ACTH-hydrolysaat, geïdentificeerd door "fingerprinting" en kleuring met specifieke aminozuurreagentia

Peptide nummer	Specifieke aminozuren aangetoond	Vermoedelijk ACTH-brodstuk
1	arg	arg
2	-	lys
3	try	9-11/9-15
4	-	19-21
5	-	12-15
6	tyr, his	?
7	arg, met, tyr, his	1-8
8	try, arg, tyr, his	9-39
9	try, arg, tyr, his, met ?	1-39
10	tyr, arg ?	18/19-39
11	-	22-39
12	arg, his	HF

*) De nummers van de peptiden corresponderen met die in figuur 27.

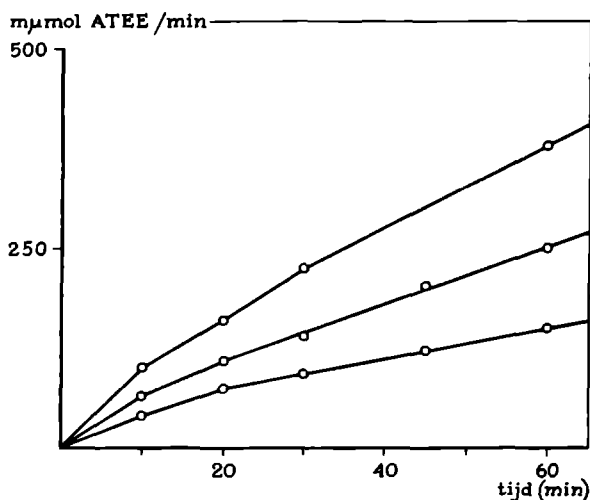


Figuur 28: De peptidebindingen van het ACTH, welke door HF worden gesplitst. De onderbroken pijlen geven de bindingen aan, die mogelijk eveneens worden gesplitst, op grond van de resultaten van de fingerprints.

motrypsinogeen A en de Hageman factor bij pH 8,5 en 30°C geïncubeerd. De hoeveelheid chymotrypsine, welke tijdens deze incubatie ontstond, werd bepaald door meting van de esterase activiteit voor N-acetyl-L-tyrosine ethylester (ATEE). Deze ester is namelijk een geschikt substraat voor chymotrypsine, maar wordt door de Hageman factor niet gesplitst (zie tabel 13). De esterase activiteit werd gemeten bij pH 7,0 door differentiaalspectrofotometrie¹⁰³.

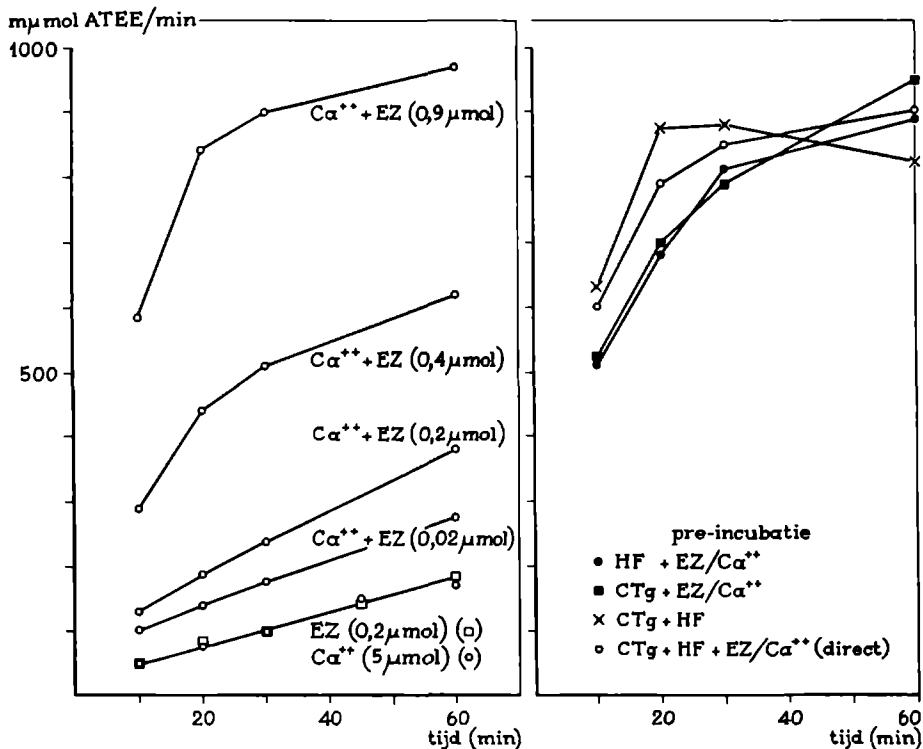
Indien chymotrypsinogeen A - in een plastic buis - met toenemende hoeveelheden HF werden geïncubeerd en na 10, 20, 30, 45 en 60 minuten de ontstane hoeveelheid chymotrypsine werd gemeten, dan werden de resultaten verkregen zoals die in figuur 29 zijn weergegeven. Zowel met toenemende incubatietijd als met toenemende Hageman factor concentraties werd een duidelijke toename in de ATEE-hydrolyse waargenomen.

Op grond van verkregen resultaten bij de stolling (zie Hoofdstuk VIII)



Figuur 29: De vorming van chymotrypsine activiteit als functie van de incubatietijd en van de HF concentratie bij incubatie van HF en chymotrypsinogeen A (CTg). Uit een incubatiemengsel werd na verschillende tijden 0,2 ml monster genomen en toegevoegd aan 3,0 ml substraatoplossing. De ATEE hydrolyse werd gedurende 7 min bij 37°C spectrofotometrisch gevolgd. Het incubatiemengsel bevatte per ml: 330 μg CTg, 50 μmol Tris-HCl buffer (pH 8,5), 10 μmol Ca⁺⁺ en resp. 73, 146 en 220 μg HF. De substraatoplossing bevatte per ml: 6 μmol ATEE, 100 μmol Tris-HCl buffer pH 7,0 en 20 μmol Ca⁺⁺. De incubatie is in plastic buizen uitgevoerd.

werd rekening gehouden met de mogelijkheid dat de geïsoleerde Hageman factor in de inactieve toestand verkeert, ondanks het feit dat de zuiveringsprocedure - waarbij o.a. adsorptie aan glaspoeder wordt toegepast - een dergelijke veronderstelling onwaarschijnlijk maakt. Wij hebben



Figuur 30: De invloed van Ca^{++} en EZ op de omzetting van CTg door de Hageman factor

De uitvoering van de metingen geschiedde zoals onder figuur 29 is aangegeven. Het incubatiemengsel bevatte per ml: 330 μg CTg, 25 μmol Tris-HCl buffer (pH 8,5), 5 μmol Ca^{++} en/of EZ in verschillende concentraties en 180 μg HF.

Figuur 31: De invloed van preïncubatie van CTg of HF met Ca^{++} en EZ op de vormingssnelheid van de chymotrypsine activiteit

0,5 ml CTg oplossing of 0,5 ml HF oplossing werden met 0,5 ml Ca^{++} en EZ gedurende 30 min bij 30°C gepreïncubeerd. Daarna werd 0,5 ml CTg of HF oplossing toegevoegd en de chymotrypsine activiteit gemeten als functie van de tijd zoals onder figuur 29 is beschreven. Analooq werd 0,5 ml CTg en 0,5 ml HF oplossing samen in ijs gepreïncubeerd en na 30 min Ca^{++} en EZ toegevoegd. Het incubatiemengsel bevatte per ml: 330 μg CTg, 25 μmol Tris-HCl buffer (pH 8,5), 5 μmol Ca^{++} , 0,9 μmol EZ en 196 μg HF.

derhalve overwogen de chymotrypsinogeen omzetting te bestuderen in aanwezigheid van een agens dat de Hageman factor activeert. Ofschoon vele oppervlakken hiervoor in aanmerking komen, werd de voorkeur gegeven aan een oplossing van ellaginezuur (EZ), waarvan het activerend vermogen is vastgesteld door Ratnoff en Crum⁷⁵. Werde het EZ aan het

incubatiemengstel toegevoegd, dan werd inderdaad een verhoogde chymotrypsinogeen omzetting waargenomen. Enigszins verrassend trad deze verhoging echter alléén op, indien Ca^{++} -ionen aanwezig waren. Het effect van EZ zonder Ca^{++} -ionen was identiek aan het effect van Ca^{++} -ionen zonder EZ. Alleen het gelijktijdig aanwezig zijn van beide resulteerde in een duidelijke toename van de chymotrypsinogeen omzetting (figuur 30). De verhoging van de chymotrypsinevorming is bij aanwezigheid van 0,02 mM EZ nog gering, bij 0,9 mM daarentegen bijzonder sterk. Hogere EZ concentraties zijn niet onderzocht.

Parallel met dit verschijnsel vertoonde 0,9 mM EZ in aanwezigheid van Ca^{++} -ionen (5 mM) een duidelijk waarneembaar precipitaat, hetgeen bij 0,4 mM reeds minder en bij 0,02 mM bijna niet waarneembaar was. Het Ca^{++} -ion is hierbij niet specifiek; een incubatie, uitgevoerd in aanwezigheid van EZ en Mg^{++} -ionen (5 mM) vertoonde een analoog verlopende verhoging van de chymotrypsinevorming, parallel met het aanwezig zijn van een precipitaat.

De toeneming van de chymotrypsinevorming in de eerste fase van de incubatie (figuur 30), vergeleken met die in het overeenkomstige experiment zonder toevoeging van Ca^{++} -ionen of EZ kan wijzen op een activering van de Hageman factor. Voor het afvlakken van de curven kon geen duidelijke verklaring gegeven worden. Wanneer een van de reactiecomponenten werd toegevoegd na een preïncubatie van de overige componenten gedurende 30 min. (overeenkomend met het afvlakken van de curven), dan werden in de vorming van chymotrypsine geen belangrijke verschillen waargenomen (figuur 31). Deze was bovendien gelijk aan die in het experiment waarin de drie componenten gelijktijdig werden geïncubeerd. Wel was in de vier genoemde incubatiemengsels de chymotrypsinevorming duidelijk verhoogd in vergelijking met het experiment waarbij geen EZ en Ca^{++} aanwezig waren. Een mogelijke verklaring voor bovengenoemde resultaten zou kunnen zijn dat de Hageman factor door EZ en Ca^{++} wordt geactiveerd of dat de interactie tussen de geactiveerde Hageman factor en chymotrypsinogeen door het aanwezige oppervlak katalytisch wordt versneld. In dit stadium van onderzoek kan geen definitieve conclusie worden gegeven, en met name dienen andere activerende oppervlakken in dit verband nog te worden onderzocht.

5.11 KORTE SAMENVATTING EN CONCLUSIE

Bij de bestudering van de esterase eigenschappen van de Hageman factor is duidelijk komen vast te staan dat de gedragingen van dit enzym karakteristieke verschillen vertonen met die van plasmine, trombine, PTA, kallikreïne, trypsine, factor Xa en andere genoemde BAEE splitsende enzymen. De Hageman factor wordt geremd door LBTI en

DFP, een eigenschap welke het verschil met trombine en factor Xa duidelijk doet uitkomen.

De Hageman factor is een proteolytisch enzym dat in staat is de polypeptiden ACTH en de B-keten van insuline te splitsen op die plaatsen, welke op grond van zijn esterase eigenschappen voor BAEE en TAME verwacht konden worden. Bovendien is een vermogen tot splitsen van bepaalde lysylbindingen vastgesteld. De waarneming dat samenbrengen van chymotrypsinogeen A en HF leidt tot het ontstaan van chymotrypsine activiteit, is in overeenstemming met zijn specificiteit voor arginylbindingen.

HOOFDSTUK VI

HAGEMAN FACTOR: EEN SIALOGLYCOPROTEINE

„Fruitfull progress occurs only when all sorts of people are thinking together about the same sort of thing.”

W.M.Seegers

6.1 INLEIDING

Tot de vorderingen welke de laatste jaren in de eiwitchemie zijn gemaakt, behoort ongetwijfeld de nadere identificering van bepaalde eiwitlichamen, welke koolhydraten covalent aan zich hebben verankerd. Zij zijn in de natuur, met name in plasma, rijkelijk aanwezig en worden met de verzamelnaam glycoproteïnen aangegeven.

Karakteristiek voor de plasma-glycoproteïnen is het ontbreken van glucose in het molecuul, doch daartegenover het gemeenschappelijk voorkomen van de hexoses galactose en/of mannose, de aminosuikers N-acetyl-glucosamine en/of N-acetyl-galactosamine, het 6-deoxyhexose L-fucose en het zure aminosuiker sialinezuur. Bij alle tot nu toe onderzochte plasma-glycoproteïnen is het totale koolhydraatgehalte procentueel kleiner dan het eiwitgehalte¹³⁷ en kan variëren van slechts 0,6% in prealbumine tot 42,6% in het α_2 -neuramino-glycoproteïne.

Het onderzoek betreffende de chemische structuur van het koolhydraatgedeelte heeft zich de laatste jaren mede door verbeterde isolatiemethoden zo sterk uitgebreid, dat hier slechts een bescheiden beschrijving gegeven kan worden. Uitgebreide overzichtsartikelen over het grote gebied van de glycoproteïnen zijn o.a. geschreven door Winzler¹⁶⁶, Schultze¹⁶⁷, Ashwell¹⁶⁸ en Spiro¹⁶⁹.

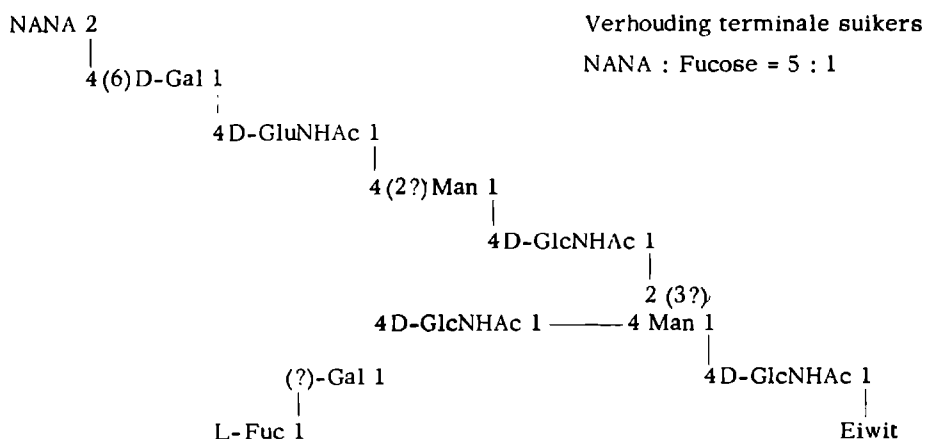
In het theoretisch gedeelte zullen wij de volgende punten nader ter sprake brengen:

- a) de structuur van de oligosacchariden in glycoproteïnen
- b) de fysiologische betekenis van het sialinezuur

In het experimentele gedeelte zal worden aangetoond dat de Hageman factor tot de klasse der glycoproteïnen behoort, waarbij tevens de invloed van het koolhydraatgedeelte op de esterase activiteit en de stollingseigenschappen zal worden toegelicht.

6,2 STRUCTUUR DER OLIGOSACCHARIDEN

De belangrijkste vorderingen in onze kennis omtrent de structuur van de oligosacchariden zijn vooral gemaakt aan die glycoproteïnen welke in grote hoeveelheid en in homogene vorm voorhanden zijn: zuur α_1 -glycoproteïne uit serum^{170,171}, zuur α_1 -glycoproteïne uit urine¹⁷², γ -globuline^{173,174}, ovalbumine^{168,175}, fetuïne¹⁷⁶ en submaxillaris glycoproteïne¹⁷⁷. In bijna al deze gevallen is duidelijk vastgesteld dat de aanwezige koolhydraten niet als één groot polysaccharide voorkomen, doch als z.g. heterosaccharide eenheden langs de eiwitketen zijn verspreid. Door Eylar en Jeanloz¹⁷⁰ is de structuur van een dergelijke eenheid, voorkomend in serum α_1 -glycoproteïne, opgehelderd. Deze ziet er als volgt uit:



Verhouding terminale suikers
NANA : Fucose = 5 : 1

Op grond van het molecuulgewicht van dit decasaccharide kon worden geconcludeerd dat 5 à 6 van dergelijke units in het α_1 -glycoproteïne voorkomen¹⁷⁰. Door Barker c.s.¹⁷² is een volkomen identieke structuur gevonden voor de heterosaccharide eenheden in zuur α_1 -glycoproteïne uit urine. Spiro¹⁷⁶ toont bij fetuïne het voorkomen van drie heterosaccharide eenheden aan, welke met bovengenoemde een grote gelijkenis vertonen, doch een grotere vertaktingsgraad bezitten. Iedere keten bevat het N-acetyl-neuraminezuur terminaal via een 2—3 binding gebonden aan 4-O- β -D-galactopyranosyl-N-acetyl-D-glucosamine, terwijl de vertakkingen in het mannose gelokaliseerd zijn. Een partiële structuur is eveneens opgesteld voor de heterosaccharide eenheid, voorkomend in ovalbumine¹⁷⁸. Smith c.s.^{173,174} nemen bij γ -globulinen het bestaan aan van één vermoedelijk vertakte eenheid per eiwitmolecule, bestaande uit mannose (5 à 6 residuen), galactose (3 residuen), glucosamine (6 residuen), fucose (2 residuen) en NANA (1 residu). Recente onderzoeken aan fibrinogeen¹⁷⁹ tonen aan dat dit eiwitmolecule 7 heterosac-

charide eenheden bevat, ieder bestaande uit galactose, mannose, glucosamine en sialinezuur in de verhouding 1 : 2 : 2 : 1. Het glycoproteïne "OSM", geïsoleerd uit de onderkaakspeekselklier van schapen, bevat daarentegen per molecule ongeveer 800 eenheden van het disaccharide N-acetyl-neuraminy-(α ,2-6)-N-acetyl-galactosamine. De structuur-opheldering van de heterosaccharide eenheden van transferrine¹⁸⁰ en thyreoglobuline²⁰² bevindt zich in een vergevorderd stadium.

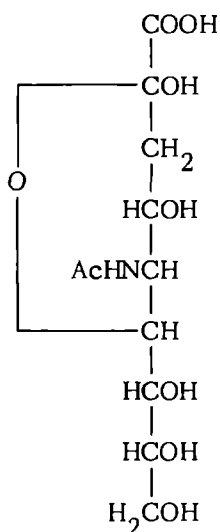
Dat in andere dan bovengenoemde glycoproteïnen eveneens dergelijke eenheden zullen voorkomen, is gebleken uit de wetmatige verhoudingen waarin de diverse koolhydraatbouwstenen in ieder glycoproteïne aanwezig zijn. Voor een aantal plasma-eiwitten zijn deze weergegeven in de overzichtsartikelen van o.a. Winzler¹⁶⁶ en Schultze¹⁶⁷.

Door deze auteurs zijn duidelijke structurele verwantschappen opgemerkt in de klasse der α -globulinen, welke laatste bijna alle een galactose-mannose verhouding van 2 : 1 vertonen, in tegenstelling tot de γ -globulinen en γ -macroglobulinen, waarbij deze verhouding omgekeerd wordt teruggevonden. Een ander kenmerk van de γ -globulinen is het relatief hoge fucosegehalte en lage neuraminezuurgehalte; het omgekeerde beeld treft men bij de andere glycoproteïnen aan.

6.3 SIALINEZUUR EN GLYCOPROTEÏNEN

Onder de koolhydraatbouwstenen in glycoproteïnen neemt het neuraminezuur een bijzondere plaats in. Dit zuur komt als zodanig niet voor in de natuur, doch wordt steeds in de geacyleerde vorm aangetroffen, zowel in glycoproteïnen, oligosacchariden als in gangliosiden. Deze derivaten, zoals N-acetyl, N-glycolyl, O,N-diacetylneuraminezuur en enkele andere worden overeenkomstig het voorstel van Blix c.s.¹⁶⁴, Zilliken en Whitehouse¹⁶⁵ met de verzamelnaam sialinezuren aangegeven.

Bij alle sialosiden, waarvan de structuur geheel of gedeeltelijk bekend is, is het sialinezuur steeds eindstandig gebonden en wel glycosidisch aan D-galactose of N-acetyl-D-galactosamine. Door het zure karakter van deze eindstandige groep - de pK van N-acetylneuraminezuur bedraagt 2,6 - wordt de lading van sialoglycoproteïnen in hoge mate beïnvloed, hetgeen langs elektroforetische weg voor vele glycoproteïnen is aangetoond. Door het enzymatisch afsplitsen van sialinezuur wordt het immunologische gedrag van de glycoproteïnen meestal niet beïnvloed; een uitzondering hierop vormen de bloedgroeps substanties. Fysiologische betekenis is wel toegekend aan het sialinezuur in submaxillaris-proteïnen, waar dit zuur een belangrijke bijdrage levert tot de viscositeit van deze stoffen¹⁸¹. Sialinezuur is ook aanwezig op het membraan van erythrocyten, waarmee samenhangt het door Hirst¹⁸² beschreven verschijnsel van de hemagglutinatie door virussen van de Myxogroep. Afsplitsing van sialine-



zuur door een op het virus aanwezige sialidase resulteert in elutie van het virus en het verlies van de eigenschap tot hernieuwde agglutinatie van de erythrocyten. Het vermogen van een aantal glycoproteïnen om als remstof bij hemagglutinatie op te treden is nauw verbonden met het al of niet bevatten van glycosidisch gebonden sialinezuur^{183,184}.

Een zeer belangrijke rol wordt door sialinezuur vervuld bij de biologische werkzaamheid van de intrinsic factor¹⁸⁵, de gonadotrope hormonen¹⁸⁶ en erythropoëetine¹⁸⁷; afsplitsing van het sialinezuur resulteert in biologisch inactieve verbindingen.

Bij sialoglycoproteïnen met enzymatische activiteit is het sialinezuur in het algemeen niet van belang gebleken voor het uitoefenen van de katalytische eigenschappen. Karakteristieke voorbeelden zijn atropine-esterase, serum cholinesterase, ocytocinase en alkalische fosfatase.

Van groot belang zijn de waarnemingen met betrekking tot de rol van sialinezuur in het bloedstollingsproces. Door Lorand c.s.¹⁸⁸ is waargenomen dat tijdens de omzetting van protrombine in trombine door een 25% citraatoplossing 60-70% van de koolhydraten vrijgemaakt worden, voordat van trombine activiteit sprake is; het sialinezuur wordt hierbij slechts voor de helft in trombine teruggevonden¹⁶⁷. Schultze en Schwick¹⁸⁹ toonden aan dat een met sialidase voorbehandeld protrombine een vele malen snellere citraatomzetting ondergaat. Nilsson en Yamashina¹⁹⁰ maken melding van een competitieve remming bij de biologische omzetting van protrombine door zuur α_1 -glycoproteïne, dat 13% NANA bevat. Door Chandrasekhar c.s.¹⁹¹ is aangetoond dat ook bij de vorming van fibrine uit fibrinogeen sialinezuur in glycosidisch gebonden vorm vrijkomt, met als gevolg een 18% lager sialinezuurgehalte van fibrine. Werd fibrinogeen voorbehandeld met sialidase, dan nam de stolbaarheid van het fibrinogeen toe naarmate meer sialinezuur was afgesplitst. Bovendien is waargenomen¹⁹² dat stolsels, ontstaan uit sialinezuur-vrij fibrinogeen, niet meer waren te stabiliseren door het enzym FSF (factor XIII). De vraag of het polaire sialinezuur eveneens bij andere fasen van het stollingsproces betrokken is, zal pas na zuivering van de desbetreffende stollingsfactoren kunnen worden beantwoord.

Vanwege het feit dat juist polaire oppervlakken in staat zijn de intrinsieke stolling te initiëren door activering van de Hageman factor, leek het ons van groot belang deze stollingsfactor op aanwezigheid van sialinezuur te onderzoeken en - indien mogelijk - deze selectief hiervan te verwijderen, teneinde vast te kunnen stellen welke rol deze geladen groepingen vervullen in het activeringsproces.

6.4 MATERIAAL EN METHODEN

Als standaard reagentia werden gebruikt D(+)galactose (Hoffman - LaRoche), D(+)mannose (B.D.H.), D-glucosamine-HCl en D-galactosamine-HCl (Sigma), L- α -fucose (Eastman Kodak Co.) en synthetisch N-acetylneuraminezuur*).

Voor de koolhydraatanalyses van de Hageman factor werd gebruik gemaakt van elektroforetisch zuiver materiaal, verkregen na DEAE-Sephadex chromatografie, zoals beschreven is onder 4.3.4. Het materiaal werd ontzout door middel van gelfiltratie over een kolom van Sephadex G 25 in water. De Hageman factor oplossing, welke na deze ontzouting een sterke opalescentie vertoonde, werd vervolgens gelyofiliseerd en bewaard boven P205 onder vacuüm bij 40°C.

Voor de bepaling van het hexosegehalte werd gebruik gemaakt van de orcinol-zwavelzuur methode, zoals die voor glycoproteïnen is ontwikkeld door Schönenberger c.s.¹⁹³; fucose bepalingen werden uitgevoerd met de cysteine-zwavelzuur methode volgens Dische, zoals die beschreven is door Schultze¹⁹⁴. Het hexosaminegehalte werd bepaald volgens de door Boas¹⁹⁵ gemodificeerde methode van Elson en Morgan, of volgens een directe methode die met uitzondering van enkele modificaties óók door Rimington¹⁹⁶ is toegepast. Het sialinezuurgehalte werd bepaald met de thiobarbituurzuur methode volgens Warren¹⁹⁷.

Sialidase experimenten werden uitgevoerd met neuraminidase verkregen uit A₂-Japan virus (Philips-Duphar) en het Receptor Destroying Enzyme uit *Vibrio cholerae* (RDE. Behringwerke), met respectievelijke activiteiten van 0,24 en 0,17 I.E. per ml, getest met urine mucine als substraat (pH 7,0).

6.5 VERHOUDING TUSSEN DE VERSCHILLENDE KOOLHYDRATEN

6.5.1 Neutrale suikers

Om na te gaan welke neutrale suikers in de Hageman factor aanwezig zijn en om hun onderlinge verhouding vast te stellen, werd de Hageman factor eerst aan een zachte hydrolyse onderworpen. De methode van Schultze¹⁹⁴, waarbij een waterige oplossing van glycoproteïnen in aanwezigheid van Dowex-50 H⁺ tot 100°C verhit wordt, resulteerde in een onvolledige hydrolyse van de Hageman factor. Betere resultaten werden verkregen met de hydrolysemethode volgens Anastassiadis en Common¹⁹⁸. Hiertoe werd ca. 3 mg HF met 600 mg Dowex-50 H⁺ in 2 ml 0,1 N HCl in een dichtgesmolten buis gehydrolyseerd gedurende 18 uur bij 100°C

*) Het N-acetyl-neuraminezuur is gesynthetiseerd door Dr.W.O.E.Wesemann van de afdeling Biochemie.

onder voortdurend mechanische trilling. Na hydrolyse werden de neutrale suikers van de hexosamines gescheiden volgens de methode van Anastassiadis en Common en vervolgens door middel van papierelektroforese bevrijd van eventuele verbindingen, die storen bij de papierchromatografische identificatie. De elektroforese omstandigheden waren: Whatman MN papier, pyridine-acetaat buffer pH 6,5 (systeem I, tabel 19), 30 V/cm, 30-45 mA, 90 min. Na drogen van het papier bij 90-100°C en localisatie van de neutrale suikers werden deze geëluëerd en overgebracht op een Whatman no.1 papier. Bovendien werd op deze papierstrook een reeks, variërend van 20-100 µg van zowel D-galactose, D-mannose als L-fucose opgebracht.

Voor de chromatografische scheiding hebben wij gebruik gemaakt van het vloeistofsysteem n-butanol-ethanol-water (10 -1 - 2 v/v); de chromatografie vond plaats in afdalende richting bij 23°C gedurende 2 x 16 uur met tussentijdse droging bij kamertemperatuur. Onder deze omstandigheden bleek de afgelegde afstand van de referentiestoffen galactose, mannose en fucose achtereenvolgens 9,5, 15 en 22,5 cm te bedragen. De kleuring geschiedde met anilineftalaatreagens volgens het voorschrift van Wilson¹⁹⁹, waarna iedere vlek kwantitatief geëluëerd werd en de intensiteit spectrofotometrisch werd bepaald. De ontwikkelde chromatogrammen toonden duidelijk de aanwezigheid van galactose en mannose aan in het hydrolysaat van de Hageman factor. Uit de kleurintensiteiten van de geëluëerde vlekken werd door vergelijking met de kleurintensiteiten van de referentiestoffen een galactose-mannose verhouding berekend van 2 : 1. Andere neutrale suikers waren afwezig. Over de aanwezigheid van fucose kon onder deze omstandigheden geen uitsluitsel verkregen worden.

Behalve bovengenoemde hydrolyse met Dowex-50 H⁺ werd ook een hydrolyse in 1 N HCl gedurende 8 uur bij 100°C uitgevoerd. Onder volkomen analoge omstandigheden van isolatie, elektroforese en papierchromatografie werd ditmaal een galactose-mannose verhouding van 1,8 : 1 gevonden. De kleuring werd echter uitgevoerd met trifenylnitrazoliumchloride volgens de methode van Fischer en Dörfel²⁰⁰.

6.5.2 Hexosamines

De bepaling van de verhouding van de hexosamines in het Hageman factor molecule is wat praktische uitvoering betreft analoog aan de bepaling van de galactose-mannose verhouding. Hierbij werd uitgegaan van de aan Dowex-50 H⁺ geadsorbeerde hexosamines (zie 6.5.1), welke volgens de methode van Anastassiadis en Common¹⁹⁸ werden geëluëerd met 2 N HCl. Voordat de papierelektroforese werd uitgevoerd, werd het eluaat zo veel mogelijk van HCl bevrijd door het bij ca. 50°C droog te blazen met een N₂-stroom en dit enige malen te herhalen. Na elektroforese in pyridine-acetaatbuffer pH 6,5 gedurende 90 min bij 1500 V en

40-55 mA, waarbij de hexosamines 8 cm in de richting van de kathode verplaatst waren, werden zij geëluëerd en chromatografisch geïdentificeerd. Als loopvloeistof voor de chromatografische scheiding van de hexosamines werd ditmaal ethylacetaat-pyridine-water (10 - 4 - 3 v/v) gebruikt; de chromatografie vond plaats in afdalende richting gedurende 19 uur bij 23°C. Na dompelen in trifenyltetrazoliumchloride werden twee vlekken duidelijk zichtbaar, die een Rf-waarde vertoonden, welke gelijk was aan de referentiestoffen D-galactosamine en D-glucosamine. Uit de intensiteit van beide geëluëerde vlekken werd een galactosamine-glucosamine verhouding van 1 : 1,9 berekend.

6,6 KWANTITATIEVE BEPALING VAN DE KOOLHYDRATEN

6,6.1 Hexosen

De kwantitatieve bepaling van het hexosegehalte werd overeenkomstig de methode van Schönerberger¹⁹³ direct op het intacte glycoproteïne uitgevoerd. Hiertoe werd aan 0,5 ml monster 9,0 ml in ijs gekoeld orcinol-H₂SO₄ reagens toegevoegd, waarna dit mengsel onmiddellijk met een Vortex-mixer intensief gemengd werd en direct weer in ijs geplaatst. Om niet reproduceerbare kleurontwikkeling tengevolge van optredende mengwarmte zoveel mogelijke elimineren, werd een extreme volumeverhouding van monster en reagens gekozen, terwijl alle oplossingen in ijs werden gekoeld. Na een "hersteltijd" van 10 minuten werden alle buizen in het donker gedurende 30 minuten in een waterbad van 80° verwarmd en vervolgens afgekoeld met leidingwater. De kleurintensiteit werd bij 425 mμ gemeten. Omdat ons gebleken was dat de methode, tengevolge van niet steeds identieke omstandigheden van kleurontwikkeling, een verschillende mate van gevoeligheid vertoonde (Tabel 24), moest worden afgezien van het gebruik van een standaard ijkcurve. Iedere colorimetrische bepaling werd daarom uitgevoerd samen met een reeks van 15 - 90 μg van een hexosemengsel, bestaande uit D-galactose en D-mannose in een verhouding van 2 : 1. Het gebruik van een galactose-mannose verhouding identiek aan die welke in de Hageman factor was gevonden, was noodzakelijk, omdat de extinctiewaarden niet alleen van de concentratie, doch ook van de verhouding van de voorkomende suikers afhankelijk was. De resultaten die op deze wijze met de Hageman factor werden verkregen en welke weergegeven zijn in Tabel 24, resulteerden in een totaal hexosegehalte van 5,9 gram per 100 gram Hageman factor.

Om na te kunnen gaan of L-fucose, dat papierchromatografisch niet kon worden aangetoond, in de Hageman factor aanwezig was, werd tevens een colorimetrische fucosebepaling uitgevoerd. Hiervoor gebruikten wij de algemeen toegepaste methode volgens Dische, waarbij het te bepalen monster gelijktijdig met een reeks van 5 tot 30 μg L-α-fucose colori-

T A B E L 24

Hexosegehalte van de Hageman factor,
bepaald volgens de orcinol methode

Experiment (N)	$E_{425m\mu}^{cm} \times 10^3$ per μg hexose *)	$E_{425m\mu}^{cm}$ HF	HF mg/ml	Hexosegehalte HF gram/100 gram
1	15,5	0,651	1,29	6,5
2	13,3	0,276	0,78	5,3
3	12,5	0,445	1,29	5,3
4	14,2	0,590	1,32	6,3
5	12,8	0,343	0,85	6,3
6	13,3	0,435	1,19	5,5
Gemiddeld				$5,9 \pm 0,2$ **)

*) Galactose-mannose verhouding 2 : 1, overeenkomstig de verhouding in de Hageman factor gevonden (zie 6.5.1).

$$**) \frac{\sqrt{\sum x^2 - (\sum x)^2 / N}}{N(N-1)}$$

metrisch bepaald werd. Het fucosegehalte van de Hageman factor, bepaald volgens deze methode, bedroeg 0,45 gram per 100 gram eiwit, hetgeen betekent dat slechts 7% van het gehalte aan neutrale suikers door dit 6-deoxyhexose geleverd wordt en het resterende gedeelte door galactose en mannose.

6.6.2 Hexosamines

Het hexosaminegehalte werd bepaald zowel met de gemodificeerde methode van Rimington¹⁹⁶ als met de methode van Boas¹⁹⁵. Deze laatste bestaat uit een hydrolyse van het eiwitmonster met behulp van HCl en kwantitatieve chromatografische isolatie van de hexosamines. Bij de gemodificeerde Rimington methode wordt afgezien van deze chromatografische isolatie en de analyse direct op het hydrolysaat uitgevoerd.

De chromatografische isolatie van de hexosamines is zowel volgens de methode van Boas als volgens de methode van Anastassiadis en Common uitgevoerd. Oriënterende proeven, uitgevoerd met 30 μg D-glucosamine-HCl gaven voor beide methoden dezelfde opbrengst, doch deze bedroeg slechts $89 \pm 2,6\%$ van de theoretische waarde, hetgeen lager is

T A B E L 25

Hexosaminegehalte van de Hageman factor

Omstandigheden bij hydrolyse bij 100°C	Bepaald hexosaminegehalte *) in gram/100 gram
8 uur in 1 N HCl	3,6 \pm 0,4
8 uur in 2 N HCl	4,8 \pm 0,3
14 uur in 2 N HCl	4,8 \pm 0,4

*) Berekend met D-glucosamine als standaard. De afwijking in het gemiddelde van 6 bepalingen is berekend zoals in Tabel 24 is aangegeven.

dan door beide auteurs hiervoor aangegeven wordt. Ook door Hartree²⁰¹ werden onlangs dezelfde resultaten verkregen en zijn bevindingen geven voor bovengenoemde verliezen een bevredigende verklaring. Wij hebben geen pogingen ondernomen om de opbrengst te verhogen, doch alle bepalingen van hexosamines, aan de Hageman factor uitgevoerd, werden overeenkomstig bovenstaande waarden gecorrigeerd.

De omstandigheden voor de hydrolyse dienen zodanig gekozen te worden dat, behalve een volledige afsplitsing van de hexosamines, ook een deacetylering van deze aminosuikers wordt bereikt, terwijl bovendien geen noemenswaardige destructie mag optreden. Hiervoor bestaan geen algemeen geldende regels, zodat de omstandigheden voor ieder glycoproteïne of mucopolysaccharide afzonderlijk dienen te worden vastgesteld. Voor de hydrolyse van de Hageman factor werden drie verschillende omstandigheden gekozen. Uit de resultaten, die zijn weergegeven in tabel 25, mag geconcludeerd worden dat de hydrolyse reeds na 8 uur in 2 N HCl bij 100°C optimaal is. Het hexosaminegehalte bedraagt 4,8 gram per 100 gram Hageman factor.

6.6.3 Sialinezuur

Het sialinezuurgehalte van de Hageman factor werd bepaald volgens de methode van Warren¹⁹⁷. Hierbij reageert glycosidisch gebonden sialinezuur niet, zodat aan de bepaling van het sialinezuurgehalte van glycoproteïnen een hydrolyse vooraf dient te gaan. Een volledige afsplitsing zonder destructie werd volgens Warren¹⁹⁷ bereikt door zure hydrolyse in 0,1 N H₂SO₄ bij 80°C gedurende 1 uur. Het sialinezuurgehalte van de Hageman factor bleek 4,4 \pm 0,1 gram per 100 gram te bedragen, berekend op synthetisch N-acetylneuraminezuur als standaard. De mogelijkheid dat naast het N-acetyl derivaat eveneens N-glycolyl- of O,N-diacetylneuraminezuur voorkomt in de uit runderbloed geïsoleerde Hageman

T A B E L 26

Koolhydraatgehalte van de Hageman factor uit runderplasma

Koolhydraat	Gehalte in % *)	Procentueel aandeel in koolhydraatgehalte	Aantal residuen**) per mol HF
Galactose	3,6	23,8	16
Mannose	1,8	11,9	8
Fucose	0,5	3,3	2-3
Hexosamine	4,8	31,8	22
Sialinezuur	4,4	29,2	12

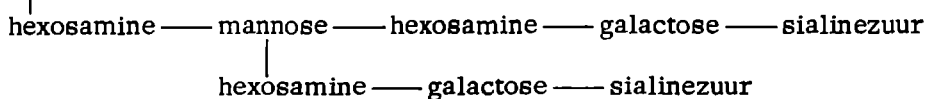
*) Berekend per 100 gram stof, zonder correctie voor vochtgehalte.

**) Berekend op MG = 82.000.

factor, is niet uitgesloten, doch dit laatste is niet verder onderzocht.

In de eerste kolom van tabel 26 is het gehalte van de koolhydraatbouwstenen welke in de Hageman factor werden gevonden, nogmaals samengevat. Indien in aanmerking wordt genomen dat de hexosamines in glycoproteïnen voorkomen in de geacetyleerde vorm, dan bedraagt het totale koolhydraatgehalte 16,1%. In redelijke overeenstemming hiermee is het gevonden eiwitgehalte van de Hageman factor, namelijk $86,3 \pm 1,3\%$ ²⁰⁴. In de derde kolom van tabel 26 is het berekende aantal residuen weergegeven zoals die in het HF molecule voorkomen, gebaseerd op een MG = 82.000. De verhouding van galactose-mannose-hexosamine-sialinezuur bedraagt 4 : 2 : 6 : 3, waarmee het voorkomen van heterosaccharide eenheden van eenvoudige moleculaire samenstelling in dit eiwitmolecule zeer waarschijnlijk is gemaakt. Een model dat aan bovengenoemde gegevens voldoet en in overeenstemming is met de huidige algemene kennis van de heterosaccharide eenheden is:

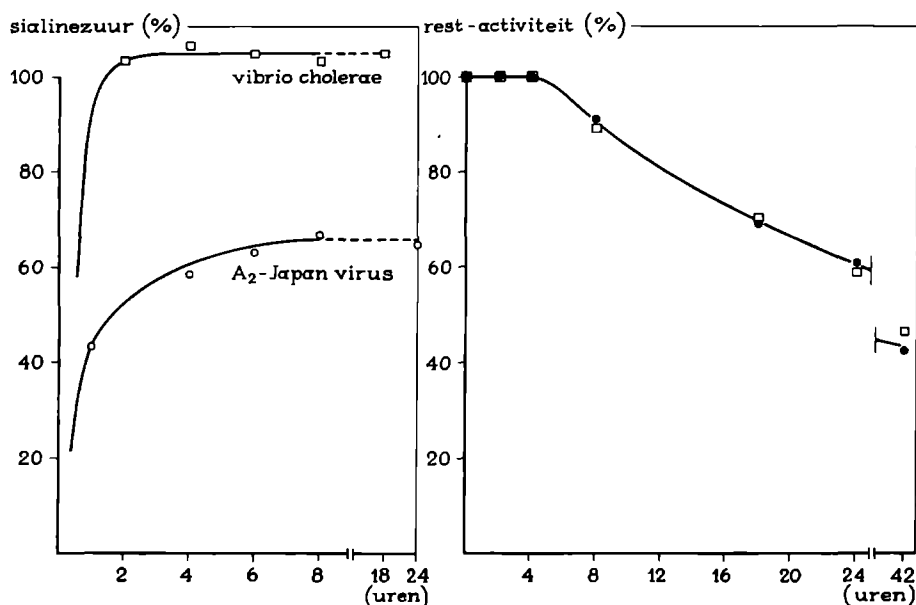
Eiwit



In het Hageman factor molecule zouden derhalve 8 van deze heterosaccharide eenheden kunnen voorkomen, waarbij in aanmerking moet worden genomen dat in enkele eenheden een sialinezuurresidu is vervangen door fucose als eindstandig molecule. In hoeverre een dergelijk model van waarde is, kan slechts door verder structuuronderzoek aan het licht gebracht worden.

6.7 HAGEMAN FACTOR EN NEURAMINIDASEN

Om over sialinezuur-vrije Hageman factor te beschikken, werd getracht dit eindstandige zuur langs enzymatische weg te verwijderen. Hier-voor werden twee neuraminidasen van verschillende oorsprong gebruikt.



Figuur 32: De invloed van de enzymatische afsplitsing van sialinezuur op de esterase activiteit en de stabiliteit van de Hageman factor

Aan een HF oplossing (3,0 ml; 1,06 mg eiwit/ml) werd 3 ml gebufferde neuraminidase of 3 ml buffer toegevoegd en het mengsel bij 30°C geïncubeerd. Na verschillende incubatietijden werd 0,3 ml mengsel gebruikt voor de bepaling van het vrije sialinezuur¹⁹⁷ en 0,2 ml voor de bepaling van de esterase activiteit, zoals beschreven is onder 3.3.2. Het incubatiemengsel bevatte per ml: 50 mIE neuraminidase (A₂-Japan of *Vibrio cholerae*) en 20 μ mol Na₂HPO₄-KH₂PO₄ buffer (pH 6,0). De esterase activiteit van de HF oplossing in buffer zonder neuraminidase is als 100% activiteit gesteld. (—●—) esterase activiteit van HF, behandeld met *Vibrio cholerae* neuraminidase; (—□—) esterase activiteit van HF zonder neuraminidase.

Incubatie van de Hageman factor met gezuiverd A₂-Japan virus neuraminidase - 50 mIE enzym per ml incubatiemengsel in 0,02 M fosfaatbuffer pH 6,0 - gaf weliswaar een afsplitsing van het glycosidisch gebonden sialinezuur, doch deze was niet volledig. Zoals in figuur 32 is weergegeven, wordt na 24 uur incubatie bij 30°C slechts 65% afsplitsing van het totale sialinezuur bereikt. Hierbij is als 100% gesteld, die

hoeveelheid sialinezuur welke in een parallel experiment door 0,1 N H_2SO_4 bij 80°C gedurende 1 uur werd vrijgemaakt. Werd de Hageman factor onder dezelfde omstandigheden - 50 mIE enzym per ml in fosfaatbuffer pH 6,0 - met het uit *Vibrio cholerae* geïsoleerde neuraminidase RDE geïncubeerd, dan werd reeds binnen 2 uur bij 30°C een afsplitsing bereikt, welke 103% bedroeg vergeleken met de overeenkomstige zuurhydrolyse (figuur 32).

De oorzaak van dit verschil in gedrag van beide neuraminidasen ten opzichte van de Hageman factor (of omgekeerd) is onbekend. Zij alleen nog vermeld dat onvolledige afsplitsingen met andere glycoproteïnen zijn beschreven o.a. in het overzichtsartikel van Gottschalk²²¹ en in enkele andere publicaties^{222,223}.

6.8 EIGENSCHAPPEN VAN SIALINEZUUR-VRIJE HAGEMAN FACTOR

Ten aanzien van de esterase eigenschappen met BAEE als substraat werd tussen HF en het sialinezuur-vrije HF geen verschil geconstateerd. Beide preparaten vertoonden na 4 uur incubatie bij 30°C - met en zonder *Vibrio cholerae* neuraminidase - dezelfde esterase activiteit. Werd de incubatietijd bij 30°C verlengd, dan vertoonden beide preparaten dezelfde vermindering in esterase activiteit als gevolg van thermische denaturatie (figuur 32).

De stollingsactiviteit van beide preparaten, slechts gemeten na 9 en 25 uur incubatie, was met bovengenoemde resultaten in overeenstemming. De verhouding stollingsactiviteit : esterase activiteit bedroeg 6,0 na 9 uur en 5,7 na 25 uur voor de onbehandelde HF en respectievelijk 5,0 en 5,2 voor het sialinezuur-vrije HF. Uit bovengenoemde experimenten mag geconcludeerd worden dat het eindstandige sialinezuur niet van invloed is op de esterase activiteit van de Hageman factor. Daarnaast wordt de stabiliteit van HF zowel ten aanzien van de esterase als de stollingsactiviteit door het verwijderen van deze polaire groepen niet gewijzigd.

De mogelijkheid dat het al of niet aanwezig zijn van sialinezuur op het enzym weliswaar niet de interactie van laagmoleculaire verbindingen, zoals BAEE, maar mogelijk wel van grotere polypeptiden en eiwitten zou kunnen beïnvloeden, werd eveneens overwogen. Als polypeptide werd het LBTI gekozen, waarvande esteraseremming werd nagegaan bij beide preparaten. De reciproke esterase activiteit als functie van de hoeveelheid toegevoegde remmer toonde bij HF een 50% remming, indien $165\text{ }\mu\text{g}$ LBTI zou toegevoegd zijn. Bij sialinezuur-vrij HF werd 50% remming reeds bereikt bij $115\text{ }\mu\text{g}$ LBTI, hetgeen zou wijzen op een verhoogde affiniteit tussen remmer en enzym.

6.9 SAMENVATTING

Samenvattend mag dus gesteld worden dat de Hageman factor behoort tot de klasse van de sialoglycoproteïnen, met als karakteristieken een hoog sialinezuurgehalte en een galactose-mannose verhouding van 2 : 1, waardoor het gerangschikt dient te worden in de klasse van de α -globulinen.

Het sialinezuur in de Hageman factor is eindstandig gelokaliseerd, gezien de volledige afsplitsbaarheid met *Vibrio cholerae* neuraminidase. Het voorkomen van 12 residuen sialinezuur doet het bestaan van minstens eenzelfde aantal saccharideketens veronderstellen, welke via vertakkingen aaneengekit zijn tot de heterosaccharide eenheden.

HOOFDSTUK VII

ENKELE FYSISCH-CHEMISCHE PARAMETERS

Achtereenvolgens zullen de uitkomsten besproken worden welke met de gezuiverde Hageman factor werden verkregen bij sedimentatie- en diffusiemetingen. Het hieruit berekende molecuulgewicht wordt vergeleken met het molecuulgewicht, verkregen door ioniserende straling en door gelfiltratie.

7.1 SEDIMENTATIEMETINGEN

De sedimentatiemetingen werden uitgevoerd met een Spinco model E analytische ultracentrifuge*), voorzien van een Philpot-Svensson optiek. Met de ultracentrifuge bestudeert men de beweging van opgeloste eiwitmoleculen in een sterk centrifugaal veld. Omdat de verplaatsing gedurende een bepaald tijdsverloop afhangt van het gewicht, de vorm en de grootte van het molecule, biedt de meting van de sedimentatiesnelheid een belangrijke informatie omtrent deze parameters van het eiwitmolecule. Door Svedberg is de sedimentatiecoëfficiënt S gedefinieerd als de sedimentatiesnelheid per eenheid van centrifugaal veld, uitgedrukt in Svedbergeenheden ($1 S = 10^{-13}$ sec.).

$$(a) \quad S_{(t,s)c} = \frac{dx/d\tau}{\omega^2 x}$$

waarin x = de afstand tot de as van rotatie

τ = tijd

ω = hoeksnelheid

$(t,s)c$ = indices voor temperatuur, oplosmiddel en concentratie

Om de sedimentatiecoëfficiënten, gemeten in verschillende oplosmiddelen en bij verschillende temperatuur, onderling te kunnen vergelijken, dienen zij herleid te worden tot een standaardtoestand. Een herleiding tot de toestand, overeenkomend met water bij 20°C, is hiervoor algemeen gebruikelijk. De sedimentatiecoëfficiënt onder de standaard-

*) De ultracentrifugemetingen werden verricht door Dr.A.G.W.J.Lansink, Drs. J.A.L.Walters en de heer J.C.M.Reynen op het Laboratorium voor Fysische Chemie (Hoofd Prof.Dr.G.A.J.van Os), waarvoor we onze erkentelijkheid willen betuigen.

omstandigheden is gedefinieerd als:

$$(b) \quad S_{(20,w)c} = S_{(t,s)c} \cdot \frac{\eta_{t,s}}{\eta_{20,w}} \cdot \frac{(1 - v\rho)_{20,w}}{(1 - v\rho)_{t,s}}$$

waarin η = viscositeit

v = partieel specifiek volume van het eiwit

ρ = dichtheid van de oplossing

$(t,s)c$ = omstandigheden van temperatuur en oplosmiddel

$20,w$ = de standaardomstandigheden van temperatuur en oplosmiddel

Het bovenstaande geldt voor alle macromoleculaire verbindingen. Er zijn echter enkele omstandigheden die de uitkomsten bij bepalingen van macromoleculen kunnen beïnvloeden. Met name kunnen potentiaalgradiënten, optredend bij sedimentatie van eiwitten in buffers van te lage ionensterkte, tot kleinere sedimentatiecoëfficiënten leiden. Om dit te vermijden wordt de sedimentatie meestal in aanwezigheid van een sterke elektrolyt, bv. 0,1-0,2 M NaCl uitgevoerd. Een tweede belangrijk punt vormt de invloed van de eiwitconcentratie. Zelfs wanneer er voor optredende drukinvloeden en verdunningseffecten in de sectorvormige cel gecorrigeerd is, blijft de sedimentatiecoëfficiënt $S_{20,w}$ een van de concentratie afhankelijke grootte. Alleen wanneer $S_{20,w}$ naar een eiwitconcentratie nul wordt geëxtrapoleerd, verkrijgt men een constante welke vergelijking met andere eiwitten zinvol maakt:

$$(c) \quad S_{20,w}^0 = \lim_{c \rightarrow 0} S_{(20,w)c}$$

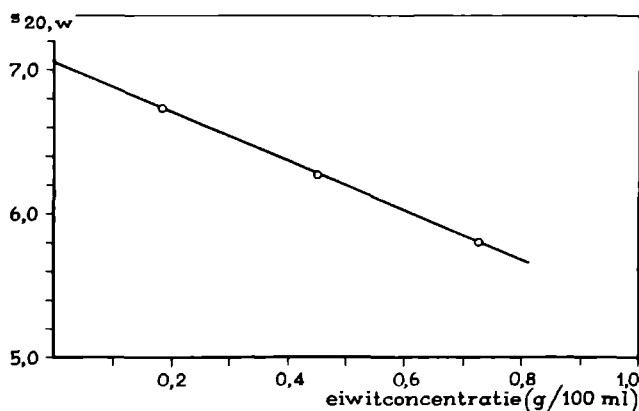
Voor de praktische uitvoering van de berekening van de sedimentatiecoëfficiënt werd basisvergelijking (a) in de geïntegreerde vorm toegepast:

$$(d) \quad S_{(t,s)c} = \frac{2,303}{60\omega^2} \cdot \frac{\log x_2 - \log x_1}{t_2 - t_1}$$

waarin ω de hoeksnelheid in rad/sec en x_1 resp. x_2 de gemeten afstanden zijn vanaf de top van de gradiëntcurve tot de rotatie-as (in cm) na t_1 resp. t_2 minuten. Voor de correctie van druk- en verdunningseffecten en de herleiding tot de standaardomstandigheden wordt verwezen naar het handboek van Elias²⁰⁵.

De Hageman factor werd opgelost in een buffer, bestaande uit 0,05 M NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 en 0,1 M NaCl, pH 6,5 ($I = 0,18$) en geruime tijd tegen dezelfde buffer gedialyseerd; vervolgens werd de oplossing in de ultracentrifuge geanalyseerd bij 59.750 opm en 20°C. De Hageman fac-

tor werd bij drie verschillende concentraties onderzocht, waarbij lagere concentraties verkregen werden door de gedialyseerde oplossing te verdunnen met het dialysaat. De zo gemeten sedimentatiecoëfficiënten, uitgezet tegen de Hageman factor concentratie, vertoonden een rechte lijn (zie figuur 33). De hieruit geëxtrapoleerde waarde $S^0_{20,w}$ bedraagt 7,08 S, terwijl voor de rechte geldt $S(20,w)_c = S^0_{20,w}(1 - kc)$, waarin k bedraagt 0,176 ml/mg.



Figuur 33: De sedimentatiecoëfficiënt $s_{20,w}$ als functie van de Hageman factor concentratie

De sedimentatiemetingen zijn uitgevoerd bij 59.750 opm. in 0,05 M NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 en 0,1 M NaCl, pH 6,5 ($I = 0,18$) bij 20°C .

7.2 DIFFUSIEMETINGEN

Door Svedberg is voor het eerst een vergelijking opgesteld welke de mogelijkheid biedt uit sedimentatiemetingen het molecuulgewicht van het betreffende macromolecule te bepalen. Deze vergelijking luidt:

$$(e) \quad M = \frac{RT S^0_{20,w}}{D^0_{20,w} (1 - v\rho)_{20,w}}$$

waarin M het molecuulgewicht, R de gasconstante, T de temperatuur in $^\circ\text{K}$ en D de diffusieconstante voorstelt. De andere symbolen zijn vermeld bij vergelijking (b). Om het molecuulgewicht te kunnen berekenen dienen behalve S^0 eveneens D^0 en v bekend te zijn.

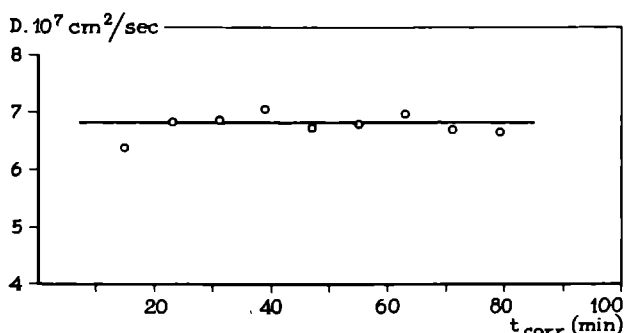
De diffusiecoëfficiënt werd eveneens met de ultracentrifuge bepaald, waarbij gebruik werd gemaakt van een z.g. "synthetic boundary cell" om

een scherp grensvlak van eiwitoplossing en oplosmiddel te verkrijgen. Het kunstmatige grensvlak in de cel werd gevormd tussen een gedialyseerde Hageman factor in buffer en het dialysaat. De buffer bestond uit 0,05 M Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 en 0,1 M NaCl, pH 6,5 ($I = 0,18$). Het toeren-tal bedroeg 12.590 opm. en de temperatuur was 20°C. Tijdens ieder experiment werden 12 opnamen gemaakt en van ieder werd de diffusie-coëfficiënt berekend volgens de oppervlaktemethode* waarbij:

$$(f) \quad D = k_A \left(\frac{A_t}{H_{\max}} \right)^2 \cdot \frac{1}{t_{\text{corr.}}}$$

waarin D = diffusiecoëfficiënt
 k_A = een apparaatconstante
 A_t = de oppervlakte onder de gradiëntcurve op tijdstip t
 H_{\max} = de hoogte van de piek der gradiëntcurve
 t_{corr} = de tijd, gecorrigeerd naar het tijdstip t_0 van de dif-fusie.

Om oppervlakte en hoogte nauwkeurig te kunnen meten, werden de plaatopnamen van de gradiëntcurve op fotografisch papier vergroot, waar-na H_{\max} werd gemeten en A_t werd bepaald door de uitgeknipte opper-vlakken te wegen en te vergelijken met het gewicht van een standaard-oppervlak van hetzelfde fotografisch papier. Voor nadere details, zoals het bepalen van de tijdcorrectie e.d. wordt verwezen naar Elias²⁰⁵.



Figuur 34: De berekende waarden voor de diffusiecoëfficiënt D als functie van de tijd van diffusie

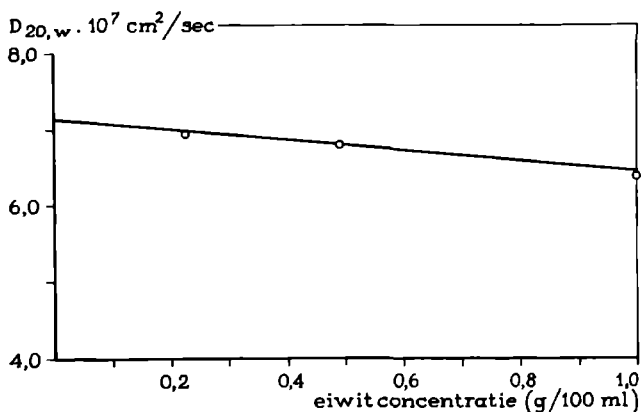
De diffusiecoëfficiënt, corresponderend bij iedere fotografische opname, werd berekend volgens de oppervlaktemethode²⁰⁵. De diffusiemetingen zijn uitgevoerd in 0,05 M NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 , bevattend 0,1 M NaCl, pH 6,5 ($I = 0,18$). HF concentratie 4,95 mg/ml, temperatuur 20°C.

In figuur 34 zijn voor één experiment de gevonden waarden van D gra-fisch uiteengezet tegen de diffusietijd. Omdat geen duidelijke tijdsafhan-

kelijkheid kon worden vastgesteld, werd voor de diffusiecoëfficiënt het gemiddelde van de gevonden waarden genomen. Deze waarde werd eveneens herleid tot de standaardomstandigheden van water en 20°C. De diffusiecoëfficiënt werd bij drie verschillende Hageman factor concentraties bepaald. Zoals uit figuur 35 blijkt, is de diffusiecoëfficiënt in geringe mate afhankelijk van de concentratie. De geëxtrapoleerde waarde naar oneindige verdunning $D_{20,w}^0$ bedraagt $7,1 \cdot 10^7 \text{ cm}^2/\text{sec}$.

Het partieel specifiek volume v van de Hageman factor is niet bepaald. Hiervoor werd de waarde 0,70 ml/gram aangenomen op grond van het feit dat deze waarde voor vele plasma-eiwitten met een aanzienlijk koolhydraatgehalte is gevonden²⁰⁶.

Uit deze drie grootheden S , D en v werd overeenkomstig vergelijking (e) voor het molecuulgewicht van de Hageman factor $M = 82.000$ gevonden.



Figuur 35: De diffusiecoëfficiënt $D_{20,w}$ als functie van de Hageman factor concentratie

Voor nadere bijzonderheden wordt verwezen naar figuur 34.

7.3 MOLECUULGEWICHT

VERKREGEN DOOR IONISERENDE BESTRALING

In samenwerking met Braams en Maters* van de afdeling Radio-biofysica van de Rijksuniversiteit Utrecht werd getracht het molecuulgewicht van de Hageman factor te bepalen door middel van protonenbestraling. De resultaten die bij dit onderzoek werden verkregen, zijn elders gepubliceerd²⁰⁷ en worden hier slechts beknopt weergegeven.

*) Voor de uitvoering van de experimenten en de berekeningen van de resultaten door Prof.Dr.R.Braams en Drs.M.Maters zijn wij veel dank verschuldigd.

Wanneer een enzym in droge toestand bestraald wordt met een bundel ioniserende deeltjes, dan treedt als gevolg van absorptie van stralingsenergie een verandering op in het eiwitmolecule welke zich o.a. kenmerkt door verlies in de enzymatische activiteit. Een uiteenzetting van de mechanismen, die voor de vernietiging van de biologisch actieve structuur verantwoordelijk worden gedacht, blijft achterwege; hiervoor wordt verwezen naar de overzichtsartikelen van o.a. Augustine²⁰⁸ en Braams²⁰⁹.

Door de onderzoeken van Lea²¹⁰ en Pollard c.s.²¹¹ is waarschijnlijk geworden dat enzymen na bestraling in droge toestand hun katalytische activiteit reeds verliezen, wanneer 1 primaire ionisatie in het betreffende eiwitmolecule wordt geplaatst.

De inactivering verloopt exponentieel met de bestralingsdosis, zodat de activiteit kan worden voorgesteld door de vergelijking:

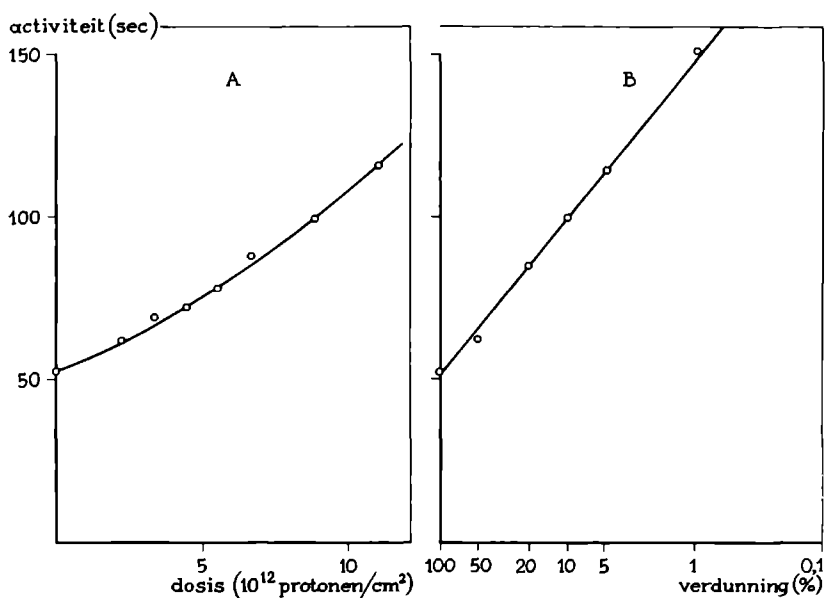
$$A_{(D)} = A_0 e^{-kD}$$

waarin D de dosis voorstelt, k een maat is voor de stralingsgevoeligheid van het betreffende enzym en A_0 de enzymactiviteit van het onbestraalde preparaat. De dosis die nodig is om de enzymactiviteit tot 37% (e^{-1}) van de oorspronkelijke waarde terug te brengen, wordt D₃₇ genoemd. Uit D₃₇ kan berekend worden hoe groot het volume is waarin gemiddeld 1 primaire ionisatie valt, wanneer met deze dosis wordt bestraald. Dit volume - het z.g. gevoelige volume - is van dezelfde orde van grootte als het volume van een eiwitmolecule en geeft de mogelijkheid de massa van één molecule en derhalve het molecuulgewicht te benaderen. Gebleken is dat de molecuulgewichten - variërend van 10^3 tot $5 \cdot 10^6$ - verkregen door stralingsexperimenten goed overeenstemmen met die welke langs fysisch-chemische weg verkregen zijn; een verschil van 50-200% van de aangenomen waarde wordt niet overschreden.

Het aantrekkelijke van deze methode is gelegen in het feit dat slechts microgrammen onzuiver enzymmateriaal hiervoor nodig zijn. Een bezwaar is dat enkele factoren de stralingsgevoeligheid en derhalve de betrouwbaarheid van de meting van het molecuulgewicht ongunstig beïnvloeden. Hoewel enkele invloeden, zoals de temperatuurfluctuaties tijdens de bestraling, de aanwezigheid van O₂, SH-verbindingen e.d. geëlimineerd kunnen worden, staat de onvolledige kennis van andere invloeden een nauwkeurige molecuulgewichtsbeplating in de weg.

Het molecuulgewicht van de Hageman factor werd bepaald door bestraling van zowel onzuivere (Cohn IV-S) preparaten als van zuiver materiaal. Gelijke hoeveelheden Hageman factor (ongeveer 60 µg) werden gepipetteerd op glazen plaatjes, in vacuüm gedroogd en vervolgens in vacuüm bestraald met een bundel protonen (1,8 MeV), afkomstig van een van der Graaffgenerator. Na bestraling werd ieder monster opgelost, endestollingstijd in duplo gemeten (figuur 36a). Met behulp van een re-

ferentiecurve, verkregen door een analoog behandeld doch niet bestraald preparaat, in een reeks te verdunnen en de stollingstijd te meten (figuur 36b), kon de resterende stollingsactiviteit van de bestraalde preparaten bepaald worden. Deze activiteit, uitgezet tegen de stralingsdosis, vertoont een exponentieel verband, dat blijft gelden zelfs na grote bestralingsdoses (figuur 37). De hieruit geïnterpoleerde waarde D37 bedraagt $3,5 \times 10^{12}$ protonen/cm². Experimenten met Hageman factor preparaten van verschillende graad van zuiverheid, gaven alle eenzelfde beeld te zien als in figuur 37 weergegeven is. De D37-waarden variëerden van $3,1 - 4,0 \times 10^{12}$ protonen/cm².



Figuur 36a: De invloed van bestraling met 1,8 MeV protonen op de stollingsactiviteit van de gezuiverde Hageman factor

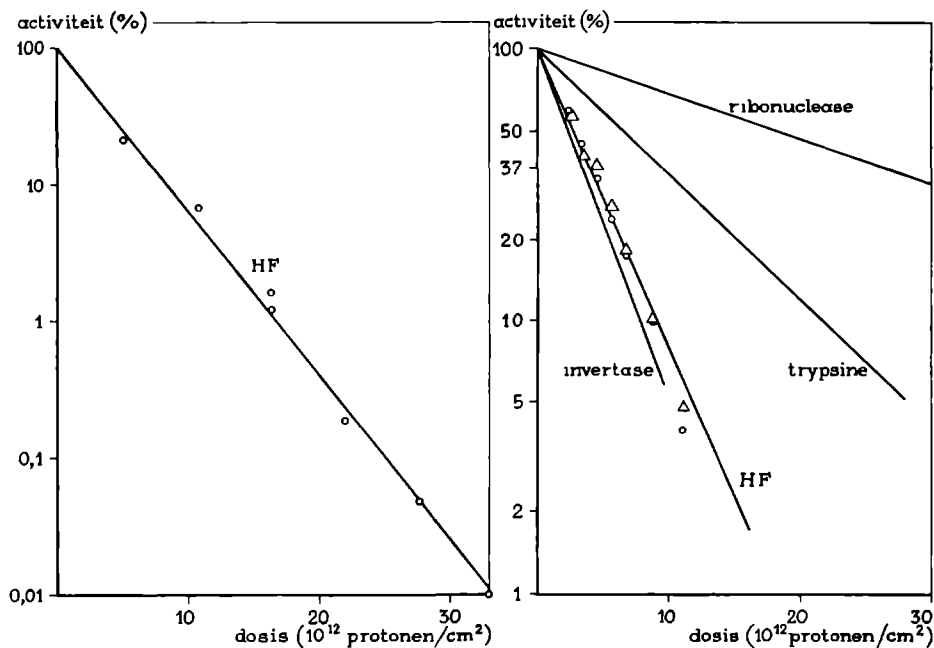
Het bestraalde HF preparaat werd opgelost in Owren's buffer en vervolgens werd 0,1 ml hiervan toegevoegd aan 0,1 ml HF-deficiënt plasma en 0,1 ml lecithine-kaoline suspensie. Na incubatie gedurende 6 min bij 37°C werd 0,1 ml 0,033 M CaCl₂ toegevoegd en de stollingsactiviteit gemeten.

Figuur 36b: Verdunningscurve van een identiek behandeld, doch onbestraald HF preparaat

Van iedere verdunning werd de stollingstijd gemeten, zoals beschreven is onder figuur 36a.

De stralingsgevoeligheid van de Hageman factor werd bovendien vergeleken met die van enkele andere enzymen, zoals trypsine, ribonuclease

en invertase. Het resultaat hiervan is weergegeven in figuur 38. De molecuulgewichten van deze enzymen bedragen respectievelijk 23.800, 13.683 en 100.000²¹². Op grond van de gemeten stralingsgevoeligheid van deze enzymen werd voor het molecuulgewicht van de Hageman factor $M = 80.000$ gevonden, waarbij de waargenomen spreiding in de D37-waarden een variatie van ± 20.000 in het molecuulgewicht veroorzaakt.



Figuur 37: Inactiveringscurve van de Hageman factor, aangevend het exponentieel verloop van de inactivering bij grote bestralingsdoses

De restactiviteit werd bepaald uit soortgelijke resultaten als in figuur 36a zijn weergegeven met behulp van een verdunningscurve (figuur 36b) van een overeenkomstig onbestraald HF preparaat.

Figuur 38: De inactiveringscurven van de Hageman factor, ribonuclease, trypsin en invertase, verkregen door bestraling met 1,8 MeV protonen

7.4 MOLECUULGEWICHT VERKREGEN DOOR GELFILTRATIE

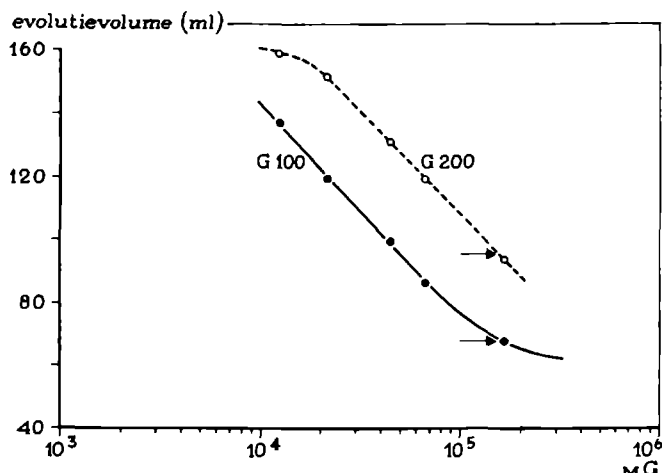
Sephadex, bestaande uit een driedimensionaal netwerk van dextran, is door de aanwezigheid van de hydroxylgroepen bijzonder hydrofiel en heeft een groot wateropnemend vermogen. Kleine moleculen, die door het netwerk niet verhinderd worden in het inwendige van de sephadex-korrel binnente dringen, kunnen zich over een groter watervolume ver-

delen dan grotere moleculen, die door hun afmetingen slechts gebruik kunnen maken van de waterfase in de minder sterk vertakte zones. Zijn de afmetingen van een molecule zo groot dat zij niet het gel kunnen binnendringen, dan kan slechts van de (mobiele) waterfase buiten de korrel gebruik worden gemaakt.

Ofschoon een fractionering slechts te verwachten is op deeltjesgrootte en -vorm, konden Andrews²¹³ en Wieland²¹⁴ bij eiwitten een nauwe relatie waarnemen tussen molecuulgewicht en elutievolume. Sindsdien zijn met succes pogingen aangewend om molecuulgewichten van eiwitten door middel van gelfiltratie te bepalen^{213,215,216}.

Het molecuulgewicht van de Hageman factor werd bepaald door dit eiwit samen met eiwitten van bekend molecuulgewicht over een Sephadex kolom (58 x 2,2 cm) te filtreren, nauwkeurig het elutievolume van ieder te bepalen en hieruit grafisch het molecuulgewicht te interpoleren. Zowel Sephadex G 100 als G 200 werden bij dit onderzoek gebruikt, terwijl voor de behandeling van het gel, het stapelen van de kolom, etc. de methode van Andrews²¹³ werd gevolgd. Om de waargenomen invloeden van temperatuur²¹⁶ en adsorptieverschijnselen aan het gel te elimineren werd de gelfiltratie steeds bij kamertemperatuur uitgevoerd in een buffer, bevattende 0,05 M Tris-HCl en 0,1 M KCl (pH 7,5). In een monstervolume van ongeveer 1 ml werden de volgende eiwitten opgebracht:

Hageman factor (0,6 - 0,9 mg droog materiaal), runder- γ -globuline (10-12 mg; $M = 169.000$), runderalbumine (8-9 mg; $M = 67.000$), oval-



Figuur 39: Het elutievolume van HF en andere eiwitten bij gelfiltratie over Sephadex G-100 en G-200 als functie van hun molecuulgewicht. Het geïnterpoleerde molecuulgewicht van HF bedraagt resp. 166.000 bij Sephadex G-100 en 154.000 bij Sephadex G-200. Voor nadere bijzonderheden wordt verwezen naar de tekst.

bumine (8-9 mg; $M = 45.000$), SBTI (2,4-3,0 mg; $M = 21.500$), cytochroom c (2,1 - 2,6 mg; $M = 12.400$). Het verloop van de eiwitelutie werd met een Uvicord UV-absorptiemeter geregistreerd en de fracties (2 ml) daarna bij 280 m μ in een Zeiss-spectrofotometer PMQ II gemeten. Cytochroom c werd gemeten bij 412 m μ . De Hageman factor concentratie werd bepaald door meting van zijn esterase activiteit voor BAEE en SBTI door de restactiviteit te meten van trypsine voor BAEE na toevoeging van SBTI-bevattende fracties. Als elutievolume V_e gold de hoeveelheid uitgelopen vloeistof, gerekend van het moment van opbrengen van het eiwitmonster tot aan het punt van maximumconcentratie van ieder eiwit, waarbij dit laatste grafisch werd bepaald door de zijden van de elutiepieken te extrapoleren naar de top.

Werden de molecuulgewichten logaritmisch uitgezet tegen de gemeten elutievolumina, dan werd zowel met G 100 als G 200 een lineair verband waargenomen (zie figuur 39). De hieruit geïnterpoleerde waarde voor het molecuulgewicht van de Hageman factor bedraagt 166.000 voor G 100 en 154.000 voor G 200. Werd de gelfiltratie uitgevoerd over G 200 bij hogere ionensterkte, met name in 0,05 M Tris-HCl buffer (pH 7,5), bevattend 1 M KCl, dan werd een $M = 150.000$ geïnterpoleerd.

7.5 DISCUSSIE

Het molecuulgewicht van de Hageman factor, verkregen door gelfiltratie, vertoont een ongeveer tweemaal zo grote waarde, vergeleken met het molecuulgewicht uit sedimentatie- en diffusiemetingen en ionenbestraling. De volgende mogelijkheden kunnen hierbij overwogen worden om deze anomalie te verklaren:

- a. een vorming van dimeermoleculen
- b. een verminderde penetratietengevolge van zure groepen in de Sephadexstructuur
- c. een molecuulvorm, sterk afwijkend van het bolvormige model
- d. een afwijkend gedrag door de aanwezigheid van koolhydraten in het HF-molecule.

Of één van de mogelijkheden of eventueel een combinatie daarvan op het Hageman factor molecule van toepassing is, is voor enkele waarschijnlijk, maar is niet verder onderzocht.

7.6 SAMENVATTING

Langs drie verschillende wegen is getracht het molecuulgewicht van de Hageman factor te bepalen. Sedimentatie- en diffusiemetingen hebben geleid tot een waarde van 82.000. In overeenstemming hiermee werd als

meest waarschijnlijke waarde $M = 80.000$ gevonden door bestraling met ioniserende deeltjes. Een bijna dubbele waarde werd waargenomen bij gelfiltratie over Sephadex G 100 en G 200. Enkele mogelijkheden, die dit waargenomen verschil veroorzaken, zijn aangegeven.

HOOFDSTUK VIII

WAARNEMINGEN

OVER HET WERKINGSMECHANISME

VAN DE HAGEMAN FACTOR

„.....the relatively small number of Factor XII molecules must appear to be very lonely and it is small wonder that nature chose surface adsorption to facilitate reaction, rather than relying on the random collision of ions and protein molecules.”

J.L.Stafford

Met de gezuiverde Hageman factor werden stollingsexperimenten uitgevoerd met het doel, een beter inzicht te verkrijgen in de reacties welke zich afspelen in de z.g. "contactfase" van de stolling. Deze contactfase en de hiermee samenhangende problemen zijn reeds besproken in Hoofdstuk II. De resultaten van het stollingsonderzoek*) zijn elders gepubliceerd^{98,217,218}, zodat we volstaan met een beknopte beschrijving van die waarnemingen en conclusies, die een directe samenhang vertonen met het verrichte biochemisch onderzoek.

8.1 PSEUDOREVERSIBILITEIT

VAN DE HAGEMAN FACTOR ACTIVERING

Om enerzijds de activering van de Hageman factor door activerende oppervlakken en anderzijds de activering van het PTA door de geactiveerde HF te kunnen bestuderen, zou men moeten beschikken over zowel de intacte (niet-geactiveerde) HF als het intacte PTA. Zoals vermeld is onder 4.3.1., werd voor de isolatie van HF uit runderplasma o.a. gebruik gemaakt van adsorptie aan glaspoeder. De erbij optredende maximale activering werd als onvermijdelijk geaccepteerd en maakt de iso-

*) Het stollingsonderzoek werd in samenwerking met Dr.C.Haanen verricht op het Hematologisch Laboratorium van de afdeling Interne Geneeskunde (Hoofd Prof.Dr.C.L.H.Majoor).

T A B E L 27

De invloed van oppervlaktecontact op de Hageman factor activiteit bij incubatie van gezuiverde HF met HF-deficiënt plasma

Stollingstest uitgevoerd in	Stollingstijd	HF activiteit *)
plastic buis	146 sec	20
glazen buis	73 sec	1000
glazen buis samen met 0,05 ml kaoline suspensie	62 sec	2250

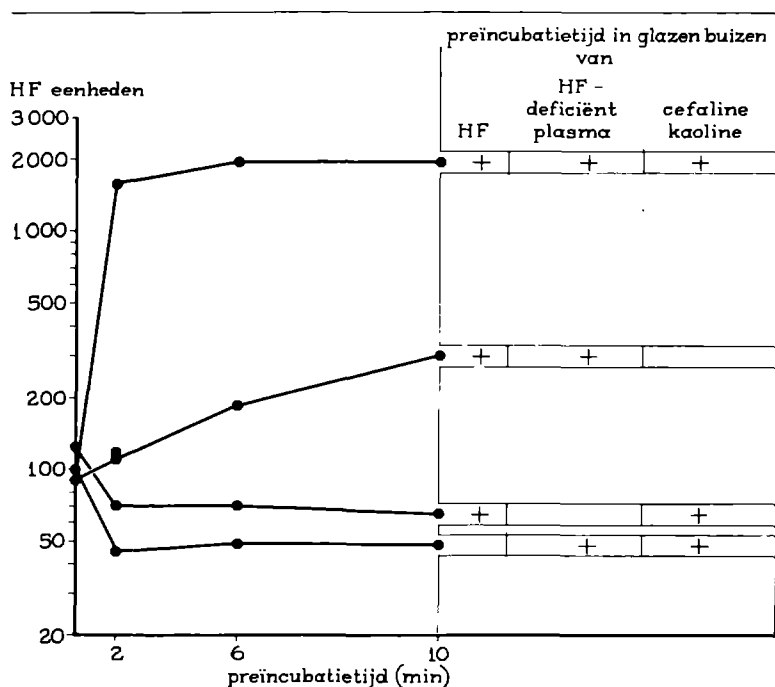
Het incubatiemengsel bestond uit 0,1 ml HF-deficiënt plasma, 0,1 ml gezuiverde HF (10 μ g eiwit/ml) en 0,1 ml "lecithine" suspensie. Na 6 min bij 37°C werd 0,1 ml 0,03 M CaCl_2 toegevoegd en de stollingstijd gemeten. De kaoline suspensie bevatte 40 mg kaoline/ml.

*) De HF activiteit is uitgedrukt in SHFA.

latie van intacte Hageman factor op deze wijze tot een illusie. Des te merkwaardiger was het toen bleek, dat wanneer de gezuiverde Hageman factor aan HF-deficiënt plasma werd toegevoegd, verschillende stollings-tijden werden verkregen naar gelang de stollingsproeven werden uitgevoerd met of zonder contact met glas of kaoline^{98,218} (Tabel 27). Een dergelijke waarneming was reeds eerder gedaan, zij het aan onzuiver materiaal van menselijke oorsprong, door Hardisty en Margolis⁴¹ en kort geleden door Ratnoff en Crum⁷⁵¹). Deze experimenten doen veronderstellen dat de geïsoleerde Hageman factor voor 99% in de inactieve vorm verkeert, maar door glas of kaoline wordt geactiveerd. Een dergelijk begrip activering houdt in dat de toename in stollingsactiviteit veroorzaakt wordt door een verandering in het HF molecule zelf, in die zin, dat contact met een activerend oppervlak de structuur van het HF molecule op zodanige wijze verandert, dat van een grotere enzymatische activiteit sprake is. Zoals echter uit figuur 40 blijkt, heeft een voorafgaande incubatie van de Hageman factor met kaoline alleen geen toename in de stollingsactiviteit tot gevolg. Een verhoging werd slechts geconstateerd, indien zowel HF als PTA als het activerend oppervlak tegelijk aanwezig zijn (figuur 40).²)

1) Dr. Ratnoff kon onze waarnemingen aan een toegezonden HF preparaat van runderplasma bevestigen.

2) In overeenstemming hiermee is dat de esterase activiteit van HF niet wordt verhoogd indien het enzym met glaspoeder of kaoline wordt behandeld. Daarentegen kon wel een duidelijke adsorptie van het enzym worden waargenomen aan kaoline, glaspoeder, celite, vetzuurmicellen en Ca-EZ.



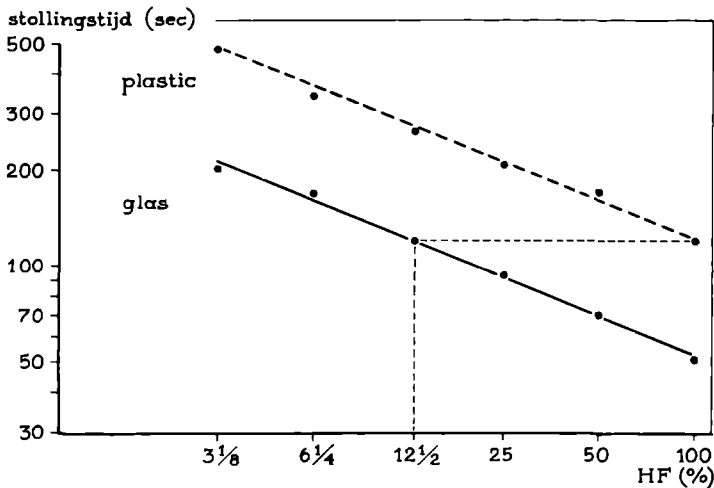
Figuur 40: De invloed van preïncubatie van HF, PTA en activerend oppervlak op de stollingsactiviteit van de gezuiverde Hageman factor

Na preïncubatie van de aangegeven componenten (+) werd de ontbrekende component toegevoegd en de stollingstijd na toevoeging van Ca^{++} -ionen gemeten. De samenstelling van het testsysteem is identiek aan die beschreven onder 3,2,2.

Een andere, meer aannemelijke verklaring voor bovengenoemde resultaten is dat de reactie tussen HF en PTA bij voorkeur plaatsvindt, wanneer beide factoren aan het oppervlak geadsorbeerd of althans daarvoor in elkaars nabijheid gebracht worden. De activerende werking van oppervlakken berust dan niet op een activering van het HF molecule, maar op het katalytisch versnellen van de reactie tussen de Hageman factor en het PTA. In overeenstemming met dit beeld is het feit, dat de reactie van HF met PTA eveneens verloopt, indien geen activerend oppervlak aanwezig is en wel des te sneller naarmate de HF concentratie groter is (figuur 41). De reactiesnelheid wordt echter aanzienlijk verhoogd, indien een contactoppervlak aanwezig is. Zijdelings mag hier worden opgemerkt dat de accelererende werking van vetzuurmicellen op de stolling door o.a. Margolis⁷⁰, Connor⁷¹, Didisheim en Mibashan⁷² en Nossel⁷³ is geïnterpreteerd als een activering van de Hageman factor. Door onderzoekingen van Botti en Ratnoff¹³⁸ is echter duidelijk gebleken dat het activerende effect niet berust op een activering van het HF mo-

lecule zelf, maar op een katalytisch versnellen van de activering van PTA door HF.

De beslissende vraag, of de geïsoleerde Hageman factor in deze vorm in het circulerende bloed aanwezig is en derhalve het begrip geactiveerde Hageman factor artificiëel door glas wordt gecreëerd, of dat het geïsoleerde enzym de geactiveerde vorm is, welke tijdens de zuiveringsprocedure is ontstaan, is niet te beantwoorden. Indien de laatste veronderstelling juist is, zou activering als een irreversibel proces moeten worden beschouwd, dat het HF molecule heeft ondergaan; een toename in de stollingsactiviteit in aanwezigheid van activerende oppervlakken moet dan als een pseudo-activering worden gekenmerkt.



Figuur 41: De invloed van oppervlaktecontact op de reactie van HF en PTA
 Teststelsysteem: 0,1 ml HF oplossing in verschillende concentraties, 0,05 ml lecithine suspensie, 0,05 ml Owren's buffer en 0,1 ml HF-deficiënt plasma in plastic of glazen buizen. Na 6 min bij 37°C werd 0,1 ml 0,033 M CaCl₂ toegevoegd en de stollingstijd gemeten.

8.2 HAGEMAN FACTOR EN FIBRINOLYSE

Reeds in Hoofdstuk I en II werden argumenten genoemd die voor het proteolytisch karakter van de Hageman factor kunnen pleiten. De vraag dient te worden beantwoord of deze enzymatische eigenschap een verklaring kan geven voor de waargenomen verschijnselen van de Hageman factor in de fibrinolyse.

Behalve de in Hoofdstuk V genoemde proteolytische reacties blijkt de Hageman factor in hoge concentraties eveneens fibrinolyse te ver-

T A B E L 28

Hageman factor gehalte en fibrinolytische activiteit van diverse fracties verkregen bij de zuivering van de Hageman factor

	Stollings-activiteit (SHFA)	Esterase-activiteit	J131-fibrinolyse (%)	Fibrineplaten		Exp.
				onverhit (mm x mm)	verhit (mm x mm)	
Al(OH) ₃ -plasma	-	1,5	0	neg.	neg.	I
		1,2	0	neg.	neg.	II
Glaspoeder-eluaat	2300	80	1,8	5,0 x 5,0	neg.	I
	2200	102	0	3,5 x 3,5	neg.	II
Cohn II + III	160	48	13,2	4,7 x 4,7	neg. *)	I
	200	79	17,4	3,8 x 3,8	neg.	II
Cohn IV-S	1800	118	2,8	neg.	neg.	I
	2900	90	3,8	neg.	neg.	II
CM-Sephadex I	7600	378	100	11,2 x 11,4	neg.	I
	5200	244	73	6,3 x 6,3	neg.	II
CM-Sephadex II	47000	2270	100	15,4 x 15,4	neg.	I
	10000	1630	100	12,5 x 13,0	neg.	II
DEAE-Sephadex	44000	6680	-	18,9 x 18,4	neg.	

De J131-fibrinolysebepaling geschiedde met fibrinestolsels, verrijkt met plasminogeen, volgens de methode van Dudok de Wit c.s.²¹⁹. De fibrine-plaatmethode geschiedde volgens Astrup en Müllertz²²⁰ met 30 µg eiwitmonster per plaat. De esterase activiteit is aangegeven in µmol BAEE/min per mg eiwit.

*) Enkele malen zwak positief gevonden.

oorzaken van met J131 gemerkte fibrinestolsels, uitgevoerd volgens de methode van Dudok de Wit c.s.²¹⁹: zie Tabel 28. Deze fibrinolytische activiteit kon van een plasmine activiteit gedifferentieerd worden, gezien het feit dat de Hageman factor geen lyse veroorzaakt op verhitte fibrineplaten, maar wel op onverhitte platen (Tabel 28). Deze resultaten tonen duidelijk aan dat HF in staat is plasminogeen in plasmine om te zetten. Dat dit activeringsproces een proteolytische reactie is, die door HF wordt teweeggebracht, wordt door de in tabel 29 vermelde resultaten aannemelijk. Parallel met de esterase activiteit treedt een vermindering op in de fibrinolytische activiteit van de met DFP geremde Hageman factor.

Opgemerkt mag worden dat de activatoren urokinase en trypsine even-

T A B E L 29

Remming van de plasminogeen-activator activiteit van HF door DFP

DFP toegevoegd (μ mol)	Esterase activiteit m μ mol BAEE/min	Lyse onverhitte plaat (mm x mm)
0	450	15,0 x 14,6
0,02	343	14,0 x 13,8
0,04	273	6,6 x 6,5
0,1	112	2,3 x 2,2
0,2	23	neg.
DP-HF*)	0	neg.

Een HF oplossing (0,4 ml; 0,50 mg eiwit/ml) werd met verschillende hoeveelheden DFP (0,2 ml) geïncubeerd gedurende 40 min bij 37°C. De esterase activiteit werd bepaald met 0,3 ml monster zoals beschreven is onder 3.3.2. De activator activiteit werd bepaald door 0,1 ml (33 μ g) monster te brengen op een onverhitte fibrineplaat²²⁰ en na 24 uur bij 37°C de lyse te meten.

*) Een HF oplossing (0,5 ml; 1,35 mg eiwit) werd gedurende 80 min met 5 μ mol DFP geïncubeerd, daarna van overmaat DFP bevrijd door Sephadex G 25 gel-filtratie en vervolgens geconcentreerd tot 0,8 mg eiwit/ml.

eens in staat zijn parallel met hun esterase activiteit voor arginine en/of lysine esters het plasminogeen in plasmine om te zetten. Het o.a. hierop gebaseerde vermoeden dat activering van plasminogeen gepaard gaat met het verbreken van arginyl- en/of lysylverbindingen, is in overeenstemming met de specificiteit van de Hageman factor.

8.3 HAGEMAN FACTOR EN DE BLOEDSTOLLING

In analogie met de waarnemingen in het fibrinolytische proces is het te verwachten dat de activering van het PTA eveneens geschiedt door proteolyse. In overeenstemming hiermee zijn de resultaten met DFP, weergegeven in figuur 11, doch een onomstotelijk bewijs zou slechts geleverd zijn, indien dit met de gebruikelijke methoden - bepaling van eindstandige aminozuren, enzymkinetische metingen, ultracentrifuge e.d. - aan het intacte en het geactiveerde PTA zou vastgesteld zijn. Het niet beschikbaar zijn van intact PTA in de geïsoleerde vorm is de voornaamste hinderpaal bij de verdere bestudering van de contactreacties op moleculair niveau. Bij ons onderzoek kon slechts van normaal intact plasma of HF-deficiënt plasma als bron voor intact PTA worden gebruik

T A B E L 30

De invloed van HF op de PTA activiteit
in aan- en afwezigheid van een activerend oppervlak

	Incubatie in plastic buizen		Incubatie in aanwezigheid van 10 mg celite/ml plasma	
	HF (sec)	PTA(sec)*)	HF (sec)	PTA(sec)*)
Normaal plasma				
na 5 min	245	266	241	262
na 90 min	250	-	260	298
na 24 uur	268	268	261	421
HF-deficiënt plasma				
na 5 min	2700	270	2700	263
na 90 min	2700	260	2700	244
na 24 uur	2700	240	2700	248

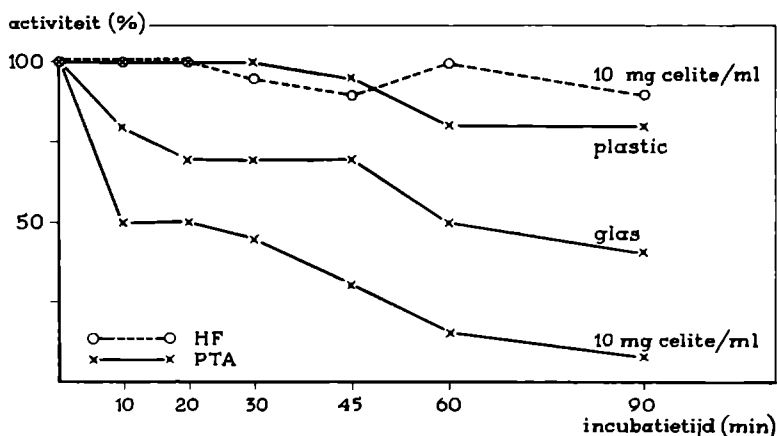
Na de aangegeven incubatietijd werd de resterende HF en PTA activiteit bepaald door 0,1 ml plasmamonster 1 : 10 met Owren's buffer te verdunnen en hiervan 0,1 ml toe te voegen aan 0,1 ml HF- of PTA-deficiënt plasma + 0,1 ml lecithine-kaoline suspensie. Na 6 min incubatie bij 37°C werd 0,1 ml 0,033 M CaCl₂ toegevoegd en de stollingstijd gemeten.

*) Het PTA-deficiënt plasma, afkomstig van een patiënt met ernstige PTA deficiëntie werd ons ter beschikking gesteld door Dr. S. I. de Vries, Amsterdam, waarvoor we onze erkentelijkheid betuigen.

gemaakt. We zijn ons ervan bewust dat het gebruik van een substraat in een dergelijke complexe samenstelling gemakkelijk tot valse conclusies kan leiden in verband met de aanwezigheid van remmers van velelei aard en een onvolledige kennis van factoren die indirect de meetresultaten beïnvloeden. Niettemin hebben we getracht conclusies aan onze verdere waarnemingen te verbinden, welke echter om bovengenoemde redenen niet als absoluut vaststaand mogen worden aangetekend.

Behalve een activering van het PTA zijn eveneens aanwijzingen verkregen, die een verdere afbraak van het geactiveerde PTA door HF doen veronderstellen. Werd namelijk normaal plasma geïncubeerd in aanwezigheid van een activerend oppervlak en de activiteit van beide stollingsfactoren onderzocht als functie van de incubatietijd, dan bleek het PTA

slechts dan te worden afgebroken, indien zowel HF als het activerend oppervlak aanwezig was (Tabel 30). De Hageman factor zelf bleef tijdens deze incubatie met het oppervlak onaangetast. Bovendien kon worden waargenomen dat de afbraak van het PTA sneller verliep, naarmate de hoeveelheid contactoppervlak groter was (figuur 42).



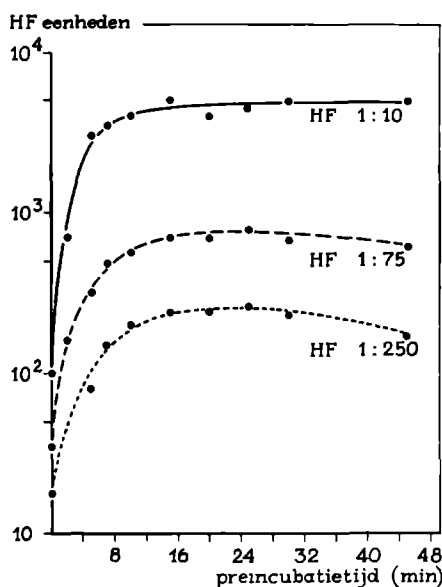
Figuur 42: Afbraak van PTA in aanwezigheid van HF en activerend oppervlak. Normaal plasma werd geïncubeerd in plastic buizen, in glazen buizen en in plastic buizen met celite in de aangegeven concentratie. De resterende HF en PTA activiteit werd gemeten zoals is beschreven onder tabel 30. De diverse activiteiten zijn uitgedrukt in percenten van de oorspronkelijke activiteit, afgelezen van een verdunningscurve, welke werd verkregen door het normale plasma in een reeks te verdunnen en de activiteit te bepalen met HF- of PTA-deficiënt plasma, zoals is vermeld onder tabel 30.

Indien in aanmerking wordt genomen dat de aanwezigheid van grotere hoeveelheden oppervlak ook steeds aanleiding geeft tot een grotere interactie van HF en PTA, dan kan de snellere afbraak van het PTA in aanwezigheid van grotere hoeveelheden oppervlak verklaard worden door de hypothese dat de Hageman factor langs proteolytische weg inwerkt op het geactiveerde PTA. De proteolytische eigenschap van HF wordt mogelijk meer specifiek door uitwendige factoren, zoals de aanwezigheid van een contactoppervlak, op dezelfde wijze als bijvoorbeeld het niet-specifieke effect van plasmine specifiek wordt t.o.v. fibrine, wanneer het plasmine eraan geadsorbeerd is.

8.4 DE INTERACTIE VAN HF EN PTA

Wanneer verschillende hoeveelheden gezuiverde Hageman factor worden geïncubeerd met HF-deficiënt plasma (als bron voor het intact PTA),

dan blijkt de hoeveelheid contactprodukt, die tijdens deze interactie ontstaat, afhankelijk van de hoeveelheid Hageman factor welke is toegevoegd (figuur 43). Wanneer echter na een bepaalde incubatietijd opnieuw Hageman factor wordt toegevoegd, ontstaat een verhoging in de hoeveelheid contactprodukt (figuur 44). Uit deze resultaten blijkt dat de Hageman factor zélf de beperkende factor is, in die zin, dat niet alleen de vormingssnelheid maar ook de hoeveelheid van het contactprodukt door HF wordt bepaald. Indien we aannemen dat het PTA inderdaad het substraat is voor HF bij de vorming van het contactprodukt, zoals o.a. door Ratnoff c.s.³⁴ en door Nossel⁷³ aangetoond is, dan treden enkele mogelijkheden als verklaring voor het bovengenoemde fenomeen naar voren:



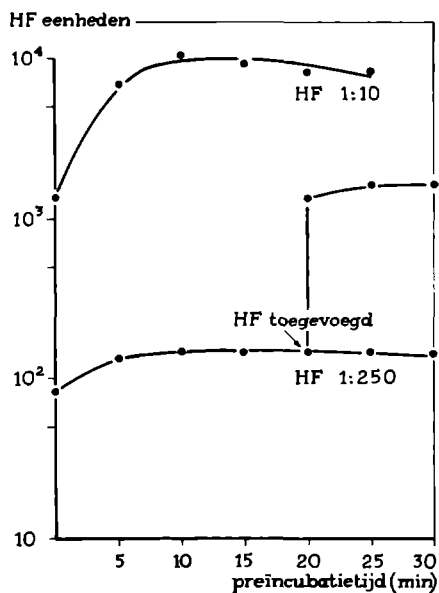
Figuur 43: Het effect van de Hageman factor concentratie op de vorming van contactprodukt

Gelijke volumina HF in verschillende concentraties, lecithine-kaoline suspensie en HF-deficiënt plasma werden bij 37°C geïncubeerd. Na diverse tijden werd aan 0,3 ml van dit mengsel 0,1 ml 0,033 M CaCl_2 toegevoegd en de stollingstijd gemeten. De verkregen stollingstijden zijn in HF eenheden uitgedrukt.

1. In het incubatiemengsel is een remmer aanwezig voor HF, afkomstig uit het HF-deficiënt plasma, die de enzymatische vorming van het contactprodukt belemmert.

Het bestaan en het eventuele karakter van een dergelijke remmer is echter niet geheel duidelijk; de beschreven remmingseffecten zijn bovendien van uiteenlopende aard. Door Ratnoff⁹⁶ is een plasma-enzym ge-

postuleerd dat de geactiveerde HF zou afbreken. Ratnoff en Rosenblum³³ toonden een remmend effect aan dat veroorzaakt zou worden door een remmer, afkomstig uit HF-deficiënt plasma, die de activering van HF zou belemmeren. Analoge waarnemingen zijn gedaan door Hardisty en Margolis⁴¹, evenals door Nossel⁷³. Een dergelijk effect kon door ons eveneens worden vastgesteld, zoals blijkt uit figuur 40. Is namelijk HF-deficiënt plasma in het incubatiemengsel aanwezig alvorens HF wordt toegevoegd, dan is de stollingsactiviteit geringer, vergeleken met een overeenkomstig experiment, waarbij eerst HF met kaoline wordt geïncubeerd en dan HF-deficiënt plasma wordt toegevoegd. Dit effect te zien als een remming op de activering van HF, is minder acceptabel dan de door Nossel⁷³ hiervoor gegeven verklaring, namelijk adsorptie van eiwitten o.a. PTA, in afwezigheid van HF. Door Margolis⁷⁹ en Nossel en Nietz⁹⁷ is een remmer beschreven die verantwoordelijk zou zijn voor het inactiveren van het contactproduct; de remming is waarschijnlijk een enzymatisch proces. Hoewel een dergelijke remmer (of enzym) niet is uitgesloten, doen de curven in figuur 43 een inactivering langs deze weg niet veronderstellen.



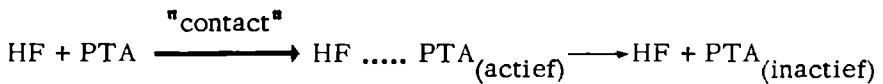
Figuur 44: Invloed van hernieuwde toevoeging van HF op de vorming van contactproduct in een plasmamonsster met een laag HF- en normaal PTA gehalte. Aan het incubatiemengsel, beschreven onder figuur 43, werd na 20 min incubatie opnieuw HF toegevoegd en de stollingstijd gemeten onder dezelfde omstandigheden als in figuur 43 is aangegeven.

2. In aanwezigheid van een contactoppervlak vormt de Hageman factor een enzym-substraat complex met het PTA. Het PTA wordt geactiveerd, doch het ontstane produkt vertoont een grote affiniteit tot de Hageman factor of het activerend oppervlak en blijft hieraan gebonden. Het gebonden, geactiveerde PTA voorkomt een verdere activering van intacte PTA door bezetten of afschermen van het enzymoppervlak.

Enkele experimentele gegevens mogen dit beeld verduidelijken:

De Hageman factor vertoont evenals het PTA een grote affiniteit tot activerende oppervlakken, zoals glas, kaoline, celite, e.d. Van deze eigenschap wordt o.a. door Waaler³⁸, Margolis⁸⁸, Soulier en Prou-Wartelle⁶⁷ en Nossel⁷³ gebruik gemaakt om "exhausted plasma" (vrij van HF en PTA) te bereiden. Wordt normaal plasma met celite behandeld, dan vertoont het plasma na verwijderen van celite slechts een geringe hoeveelheid contactprodukt^{38,73}, het van het celite verkregen eluaat daarentegen is in staat zowel HF- als PTA-deficiënt plasma volledig te corrigeren. Een overeenkomstig eluaat, bereid van HF-deficiënt of PTA-deficiënt plasma, vertoont deze eigenschap niet⁷³. Deze resultaten zijn slechts te verklaren, indien aangenomen wordt dat HF en PTA in aanwezigheid van een oppervlak aanleiding kunnen geven tot geactiveerd PTA, dat op zijn beurt aan het oppervlak blijft geadsorbeerd.

Een dergelijk beeld kan echter geen duidelijke verklaring geven voor het verloop van de curven, zoals weergegeven in figuur 43 en 44. Indien HF slechts enzymatisch verantwoordelijk is voor de activering van het PTA, wordt alleen de vormingssnelheid van het contactprodukt en niet de uiteindelijk bereikte hoeveelheid contactprodukt door HF bepaald. Bovendien geeft bovengenoemd beeld geen verklaring voor het feit dat in serum nog ongebruikt (intact) PTA overblijft. Indien echter wordt aangenomen dat HF aan het oppervlak wordt geadsorbeerd en na interactie met PTA het geactiveerde PTA tijdelijk bij zich gebonden houdt, dan is de vormingssnelheid van dit produkt afhankelijk van HF, de hoeveelheid van zowel HF als PTA. Tijdens deze complexfase breekt de Hageman factor het geactiveerde PTA verder af, zodat na enige tijd het contactprodukt zijn stollingsactiviteit verliest, terwijl HF overblijft. Schematisch weergegeven:



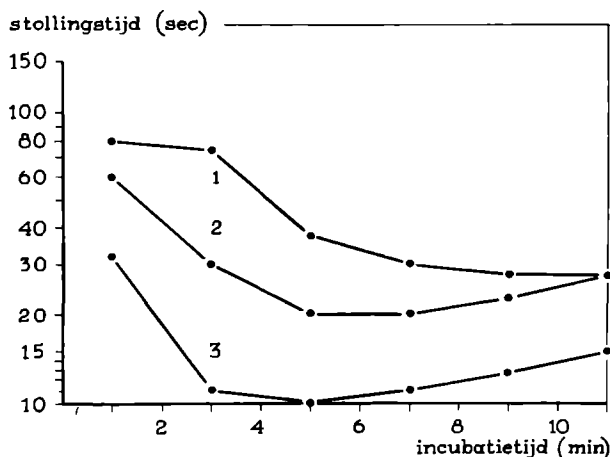
Behalve de bovengenoemde waarnemingen geeft een dergelijk reactiemechanisme eveneens een verklaring voor de volgende experimentele gegevens:

- a. Het PTA wordt slechts geactiveerd, indien HF aan het oppervlak geadsorbeerd is^{41,67,73}
- b. De vormingssnelheid van het contactprodukt wordt door HF, de uiteindelijk gevormde hoeveelheid contactprodukt door HF en PTA be-

paald.

- c. De adsorptie van PTA uit normaal plasma aan celite gaat steeds gepaard met een adsorptie van HF.
- d. De adsorptie van PTA aan celite is verminderd indien geen HF aanwezig is⁶⁷.
- e. De hoeveelheid in het plasma overgebleven PTA, na behandeling van normaalplasma met toenemende hoeveelheden celite en verwijdering van dit adsorbens, is omgekeerd evenredig met de hoeveelheid contactproduct welke zich aan het adsorbens bevindt⁷³.
- f. De inactivering van het PTA treedt alleen op, wanneer de Hageman factor aanwezig is tijdens de incubatie met het contactoppervlak (figuur 42 en tabel 30).

Nadrukkelijk moet worden opgemerkt dat het adsorptieproces van HF en PTA en de hieropvolgende activering van de laatste "dynamischer" is dan het geschetste beeld kan suggereren. Werd namelijk een z.g. "Thromboplastin Screening Test" uitgevoerd, zoals beschreven is door Hardisty en Margolis⁴¹, dan werden waarnemingen gedaan, welke dit deden veronderstellen. De resultaten van deze experimenten zijn weergegeven in figuur 45.



Figuur 45: "Thromboplastin Screening Test" van HF-deficiënt plasma in glazen buizen (1), in buizen "gecoated" met normaal plasma gedurende 3 dagen (2) en met hetzelfde normaal plasma nadien gedurende 10 minuten (3)
Na "coating" werd in iedere buis geïncubeerd: 0,9 ml 0,15 M NaCl, 0,1 ml HF-deficiënt plasma, 0,1 ml lecithine suspensie en 0,1 ml 0,025 M CaCl₂. Na de aangegeven incubatietijden werd 0,1 ml mengsel samengebracht met 0,1 ml normaal plasma en 0,1 ml 0,025 M CaCl₂ en de stollingstijd gemeten. Het "coaten" geschiedde door de glazen buizen gedurende 3 dagen (buis 2) of erna gedurende 10 min (buis 3) in contact te brengen met normaal plasma en vervolgens 10 x te spoelen met 0,15 M NaCl oplossing.

Indien een glazen buis gedurende 10 minuten werd "gecoated" met normaal plasma en vervolgens 10 maal gewassen met 0,15 M NaCl, dan bleek dezelfde buis in staat de gestoorde protrombine-activator vorming van HF-deficiënt plasma volledig te corrigeren, wanneer dit plasma in deze buis werd geïncubeerd. Werd normaal plasma gedurende 3 dagen in een glazen buis bewaard, de buis vervolgens op analoge wijze gewassen en daarna met HF-deficiënt plasma geïncubeerd, dan bleek echter geen correctie meer op te treden. Het drie dagen in genoemde buis bewaarde plasma was daarentegen wel in staat een verse buis in 10 minuten zodanig te "coaten" dat weer volledige correctie van de protrombine-activator vorming in HF-deficiënt plasma optrad.

Het verschijnsel dat het drie dagen oude plasma nog in staat is een onbehandeld glasoppervlak te bezetten met contactprodukt, doet sterk vermoeden dat het glasoppervlak van de buis, dat drie dagen in contact was met dit plasma, bezet moet zijn geweest met geblokkeerde Hageman factor of andere eiwitmoleculen; eventueel met verbindingen, die overeenkomstig hun affiniteit tot glas een verdere adsorptie van de Hageman factor onmogelijk maken.

Een dergelijk uitwisselingsproces is waarschijnlijk, enerzijds omdat van plasma-eiwitten op grond van hun polaire en apolaire groeperingen een affiniteit tot glas verwacht mag worden^{65,77}, anderzijds omdat een adsorptie van PTA aan het geadsorbeerde HF molecuul de affiniteit van het laatste tot het betreffende oppervlak kan wijzigen. Een dergelijk mechanisme is reeds op grond van ellipsometrie van HF en PTA aan polaire en apolaire oppervlakken door Vroman^{62,77,78} opgesteld. Met een dergelijk uitwisselingsproces in gedachte, kan men licht begrijpen dat het glasoppervlak op den duur bezet zal zijn met stollingsinactieve eiwitten, die een verdere adsorptie resp. activering van HF en PTA onmogelijk maken. Het verschijnsel dat serum of oud plasma nog steeds intact PTA bezit, is met een uitwisselingsproces in overeenstemming te brengen.

8,5 CONCLUSIE EN SAMENVATTING

Op grond van de in dit hoofdstuk vermelde resultaten, vonden we argumenten om aan te nemen dat de in de stollingsfysiologie gebruikelijke term "contactactivering" van de Hageman factor niet hoeft te betekenen dat de structuur van dit eiwitmolecuul een zodanige verandering ondergaat dat van een grotere enzymatische activiteit sprake is. Het verschijnsel "contactactivering" kon namelijk met de geïsoleerde Hageman factor volledig worden nagebootst, zonder dat een activering in bovengenoemde zin kon worden aangetoond. De verhoogde stollingsactiviteit kon alleen worden vastgesteld, indien zowel HF, PTA als het contactoppervlak gelijktijdig aanwezig waren. Het begrip contactactivering van de Hageman factor moet mogelijk getransformeerd worden tot een ka-

talytisch versnellen van de enzymatische reactie tussen HF en PTA door preferente adsorptie van beide aan het oppervlak.

Behalve het vermogen tot enzymatische activering van het PTA blijkt de Hageman factor eveneens een plasminogeen-activator werking te bezitten. Beide processen worden door DFP geremd.

De resultaten, verkregen bij de bestudering van de reacties welke deel uitmaken van de contactfase, hebben aangetoond dat de activering van het PTA door HF complex verloopt, in die zin, dat geen volledige omzetting van het PTA wordt bereikt, onafhankelijk van de toegevoegde hoeveelheid HF. De hoeveelheid contactprodukt, die ontstaat, wordt mede door HF bepaald.

Hoewel een remmend mechanisme hiervoor verantwoordelijk kan worden gedacht, vonden we argumenten om te veronderstellen, dat HF na adsorptie aan het activerend oppervlak het PTA vermoedelijk langs proteolytische weg activeert, maar het geactiveerde PTA bij zich gebonden houdt. Dit complex is het stollingsactieve principe, dat voor de verdere katalysering van het bloedstollingsproces zorg draagt. Waarschijnlijk werd gemaakt, dat het gebonden actieve PTA door HF verder wordt afgebroken tot stollingsinactieve verbindingen.

SAMENVATTING

Het reeds lang bekende verschijnsel dat bloed binnen enkele minuten stolt, wanneer het met glasoppervlakken in aanraking komt, heeft velen tot experimenteel onderzoek verleid. Sinds 1955 is het bekend dat glas zijn versnellende werking op de stolling uitoefent door een interactie met een specifiek plasma-eiwit, de Hageman factor. Dit proefschrift beschrijft een experimenteel onderzoek betreffende de isolatie en de enzymatische eigenschappen van deze bloedstollingsfactor.

Na een uiteenzetting van de huidige inzichten in het stollingsproces (Hoofdstuk I) wordt in Hoofdstuk II een overzicht gegeven van onze kennis van de Hageman factor en worden de processen waarbij deze factor een belangrijke rol vervult, nader toegelicht. Deze zijn de bloedstolling, de fibrinolyse en het proces van de kininevorming. Omdat deze processen sneller verlopen in aanwezigheid van glas of andere activerende oppervlakken, wordt algemeen aangenomen dat glas de Hageman factor activeert en de geactiveerde vorm vervolgens verantwoordelijk is voor het op gang brengen van genoemde processen. De moleculaire veranderingen die het Hageman factor molecuul tijdens activering ondergaat, zijn onbekend; de eigenschappen van het oppervlak hiervoor verantwoordelijk eveneens. De bestaande problemen hieromtrent worden in dit hoofdstuk besproken.

Het experimentele gedeelte van dit proefschrift wordt voorafgegaan door een beschrijving van de methoden die door ons ontwikkeld zijn om de Hageman factor activiteit te bepalen. De eerste methode berust op het corrigeren van de verlengde stollingstijd van HF-deficiënt plasma; de tweede methode maakt gebruik van de eigenschap dat de Hageman factor de hydrolyse van α -N-benzoyl-L-arginine ethylester katalytisch versnelt. De stollingsmethode blijkt weliswaar de gevoeligste, doch de reproduceerbaarheid is minder dan die van de esterasesmethode. Onder de omstandigheden die bij de stollingsmethode van toepassing zijn, treedt een variatie in de stollingstijd op van 6-7%, hetgeen een afwijking van 20% in de overeenkomstige stollingsactiviteit tot gevolg kan hebben. De standaarddeviatie van de esterasesmethode is in de orde van grootte van 1,5 - 5%, afhankelijk van de Hageman factor concentratie welke bij de meting is gebruikt.

In hoofdstuk IV wordt de isolatie van de Hageman factor uit runderplasma beschreven. Bij deze isolatie wordt achtereenvolgens gebruik gemaakt van $Al(OH)_3$ -gel adsorptie, adsorptie aan glaspoeder en elutie bij pH 9,6 en hoge NaCl-concentratie, gevolgd door gefractioneerde precipitatie met ethanol bij lage temperatuur en chromatografie en rechromatografie over CM-Sephadex. De laatste zuiveringsstap bestaat uit chromatografie over DEAE-Sephadex. De geïsoleerde Hageman factor gedraagt zich tijdens polyacrylamide-gel elektroforese (disc-methode) als een homogeen eiwit. Hetzelfde resultaat wordt o.a. bij disc-elektro-

forese in 6 M ureum, bij kolom-elektroforese en bij metingen in de ultracentrifuge verkregen. De Hageman factor vertoont een esterase activiteit van ca. 7500 μmol BAEE/min per mg eiwit (bij 1 mM BAEE) en een stollingsactiviteit van 20.000 - 40.000 HF-eenheden per mg eiwit. De zuiveringsfactor is minimaal 6000, doch deze zal vermoedelijk meer bedragen i.v.m. schijnbare activiteiten in het uitgangsmateriaal, die niet van de Hageman factor activiteit onderscheiden kunnen worden. Opmerkelijk is de geringe invloed van temperatuur en pH op de stabiliteit van de Hageman factor, zowel ten aanzien van de stollingsactiviteit als van de esterase activiteit.

In hoofdstuk V worden de enzymatische eigenschappen van de Hageman factor nader omschreven. Als belangrijkste resultaten zijn hierbij te vermelden: van de onderzochte aminozure esters blijken alleen BAEE en TAME geschikte substraten voor de Hageman factor te zijn. De hydrolyse van deze esters verloopt optimaal bij pH 8,5 en is van de nulde orde, indien de substraatconcentratie resp. 6 mM BAEE en 16 mM TAME bedraagt. De gevonden K_m waarden bedragen $4,7 \times 10^{-4}$ M BAEE en $1,6 \times 10^{-3}$ M TAME, terwijl als specifieke activiteit - uitgedrukt in $\mu\text{mol}/\text{min}$ per mg eiwit - resp. 10,7 en 11,4 werd gevonden. De Hageman factor vertoont geen amidase activiteit tegenover het p-nitroanilide of het β -naftylamide van N-gesubstitueerd arginine.

Op grond van de invloed welke de onderzochte remmers op de esterase activiteit van de Hageman factor uitoefenen, is een SH-afhankelijkheid onwaarschijnlijk. Bovendien vertoont de Hageman factor karakteristieke verschillen met plasmine, trombine, PTA, kallikreïne, trypsine, factor Xa en enkele andere in dit hoofdstuk genoemde BAEE-splitsende enzymen. Enkele uit serum geïsoleerde remmers voor plasmine, trypsine of chymotrypsine hebben op de enzymactiviteit van de Hageman factor geen invloed. De Hageman factor wordt slechts geremd door DFP en LBTI, terwijl ureum en LiBr een reversibele enzyminactivering kunnen veroorzaken.

Met behulp van de polypeptiden ACTH en de B-keten van geoxydeerde insuline kon duidelijk een proteolytisch karakter van de Hageman factor worden vastgesteld. Op grond van de aminozuursamenstelling van de verkregen peptidebrokstukken kon worden geconcludeerd dat de Hageman factor in staat is arginyl- en lysylbindingen in deze polypeptiden te hydrolyseren.

Uit de resultaten van hoofdstuk VI blijkt dat de Hageman factor behoort tot de klasse der sialoglycoproteïnen. De koolhydraatbouwstenen zijn galactose en mannose, voorkomend in de verhouding 2 : 1, N-acetylglucosamine en N-acetylgalactosamine, eveneens in de verhouding 2 : 1, sialinezuur en fucose. De verhouding van galactose-mannose-hexosamine-sialinezuur bedraagt 4 : 2 : 6 : 3, waarmee het voorkomen van heterosaccharide eenheden van eenvoudige moleculaire samenstelling in het Hageman factor molecule waarschijnlijk is gemaakt. Een model van een dergelijke eenheid is opgesteld. Het sialinezuur is eindstandig, gezien de volledige afsplitsbaarheid met *Vibrio cholerae* neuraminidase. Het

afsplitsen van sialinezuur is niet van invloed op de esterase- en stollingseigenschappen van de Hageman factor, terwijl evenmin een verminderde stabiliteit van het sialinezuur-vrije enzym kon worden waargenomen. Wel bleek de affiniteit tussen de remmer LBTI en de Hageman factor na verwijdering van de polaire sialinezuurgroepen met ca. 40% te zijn toegenomen.

In hoofdstuk VII worden de resultaten beschreven die verkregen zijn bij sedimentatie- en diffusiemetingen. Voor de Hageman factor werd een $s_{0,20,w}^{20} = 7,08$ S en een $D_{0,20,w}^{20} = 7,1 \times 10^{-7}$ cm²/sec. gevonden. Het molecuulgewicht, berekend uit deze grootheden, bedraagt 82.000 en is in overeenstemming met de waarde welke door protonenbestraling voor de Hageman factor werd bepaald (80.000). Het molecuulgewicht, verkregen door Sephadex gelfiltratie, heeft ongeveer de dubbele waarde.

Tot slot worden in hoofdstuk VIII de resultaten beschreven die zijn verkregen met de gezuiverde Hageman factor in het stollingsproces en de fibrinolyse. De geïsoleerde Hageman factor blijkt, indien toegevoegd aan HF-deficiënt plasma, tot kortere stollingstijden aanleiding te geven, indien glas of kaoline aanwezig is, vergeleken met overeenkomstige experimenten, uitgevoerd in plastic buizen. Stollingsfysiologisch betekent dit, dat de geïsoleerde Hageman factor in de inactieve vorm verkeert, maar door glas of kaoline wordt geactiveerd. Deze "contact activering" mag niet gezien worden als een zodanige structuurverandering van het Hageman factor molecule, dat van een grotere enzymatische activiteit sprake is. Het verschijnsel contact activering kan met de geïsoleerde Hageman factor volledig worden nagebootst, zonder dat een moleculaire enzymatische activering kan worden waargenomen. Het begrip activering door contact moet mogelijk getransformeerd worden tot een katalytisch versnellen van de enzymatische reactie tussen HF en PTA door preferente adsorptie van beide aan het oppervlak.

Behalve het vermogen tot enzymatische activering van het PTA blijkt de Hageman factor eveneens een plasminogeen-activerende werking te bezitten. Beide enzymatische reacties worden geremd door DFP.

De enzymatische activering van het PTA blijkt niet volgens een reactie van de nulde orde te verlopen, indien tijdens de reactie een contactoppervlak aanwezig is. De hoeveelheid contactproduct die onder deze omstandigheden wordt gevormd, wordt mede door de hoeveelheid toegevoegde HF bepaald, terwijl bovendien geen volledige omzetting van het PTA wordt bereikt. Op grond van eigen waarnemingen en literatuurgegevens vonden we argumenten voor de veronderstelling, dat de Hageman factor na adsorptie aan een activerend oppervlak het PTA, vermoedelijk langs proteolytische weg, activeert. Het ontstane product - het geactiveerde PTA - vertoont een grote affiniteit of tot het enzymoppervlak of tot het contactoppervlak waaraan het enzym is geadsorbeerd, waardoor een afscherming van het enzym tot stand komt die verdere activering van PTA onmogelijk maakt.

SUMMARY

The ability of human blood to remain liquid *in vivo* and to clot rapidly in glass has tempted a multitude of thinkers to experimentation. Since 1955 it has been generally accepted that the accelerating effect of glass on blood coagulation is mediated by a specific plasma protein, the Hageman factor. Numerous investigations have demonstrated that this clot-promoting protein exists in normal plasma in an inactive form. Exposure of plasma to glass or a number of similar agents converts Hageman factor into an active, procoagulant substance, activated Hageman factor. This thesis deals with the isolation of Hageman factor from bovine plasma and a detailed study of the enzymic properties of this clotting factor in order to increase our understanding of the activation process and the initiation of clotting.

After an introduction describing the current views on blood coagulation (Chapter I) a review is given in Chapter II of our present knowledge about Hageman factor and the processes in which this factor is involved. Evidence exists that Hageman factor not only initiates blood coagulation, but is also concerned in fibrinolysis and in plasma kinin formation. Thus this factor would form a common link between these three processes, which initiate the general and local reactions of the body to injuries.

The experimental part of this thesis starts with a description of the methods developed by us for the determination of Hageman factor activity. The first method is based on the ability of Hageman factor to correct the prolonged clotting time of HF deficient plasma. The second method employs the enzymic hydrolysis of α -N-benzoyl-L-arginine ethylester by Hageman factor. Though the clotting time assay is more sensitive, the esterase method is more reproducible. Even under strictly standardized conditions, described in detail, variations in clotting time of 6-7% could be observed, which may result in a deviation of about 20% in the graphically evaluated clotting activity. Due to a non-linear relationship in clotting time at high Hageman factor concentrations even larger deviations may occur. The standard deviation of the esterase method amounts to about 1.5-5%, depending on the Hageman factor concentrations used in the experiments.

In Chapter IV the isolation of Hageman factor from bovine plasma is described. In this procedure normal citrated bovine plasma was submitted respectively to aluminium hydroxide adsorption, adsorption on powdered glass with selective elution at pH 9.6 and 1 M NaCl, and fractionated precipitation with cold ethanol to isolate fraction Cohn IV-S. Further purification was achieved by twice repeated chromatography on CM-Sephadex at pH 5.2 and subsequent chromatography on DEAE-Sephadex at pH 7.5. Polyacrylamide gel electrophoresis (disc technique) at pH 9.5 or pH 4.5 exhibited one band only, indicating that the protein was homogeneous. Similar homogeneity was observed with disc electrophoresis at

pH 9.5 in 6 M urea, in Sephadex column electrophoresis and in sedimentation experiments. The isolated Hageman factor possesses an esterase activity of 7500 μ moles BAEE/min per mg of protein (at 1 mM BAEE, pH 8.5 and 37°C) and a clotting activity of 20,000-40,000 HF units per mg of protein. Specific activity is increased at least 6000 x by this isolation procedure. An even higher degree of purification is not excluded because of the presence of esterase and clotting activity other than HF in the starting material. Tests of the effects of pH and elevated temperature revealed a remarkable stability of Hageman factor, both as regards to esterase and to clotting activity.

The enzymic properties of Hageman factor are described in Chapter V. Of various amino acid esters tested as substrates only α -N-benzoyl-L-arginine ethylester (BAEE) and p-Tosyl-L-arginine methylester (TAME) appeared to be hydrolysed at significant rates. Hydrolysis was optimal at pH 8.5, whilst zero order reaction kinetics were obtained at 6 mM BAEE and 16 mM TAME. The Michaelis-Menten constants were 4.7×10^{-4} M for BAEE and 1.6×10^{-3} M for TAME; the specific activity, expressed in μ moles/min per mg of protein, was 10.7 and 11.4 respectively. No amidase activity could be observed towards p-nitro-anilide or β -naphthylamide of α -N-substituted arginine.

Characteristic differences between the effects of a variety of inhibitors on the esterase activities of HF and those of plasmin, thrombin, kallikrein, PTA, trypsin, chymotrypsin, factor Xa and some other enzymes hydrolysing BAEE were established. Ovomucoid, soybean trypsin inhibitor, ϵ -aminocaproic acid, Trasylol, Iodoacetic acid, p-chloromercuribenzoate, heparin and β -indole propionic acid, known inhibitors of one or another of the above substances, were all ineffective to HF. Serum inhibitors like α_1 -antitrypsin, α_1 -antichymotrypsin, inter- α -trypsin inhibitor and α_2 -macroglobulin did not inhibit esterase activity of Hageman factor, thus establishing that the isolated bovine Hageman factor was different from any of the esterases mentioned above. In contrast lima bean trypsin inhibitor and diisopropylphosphorfluoridate had a remarkable inhibitory effect on HF. Urea and LiBr are able to bring about a reversible enzyme inactivation.

Besides esterase activity Hageman factor exhibits definite proteolytic activity. The polypeptides β -corticotropin (ACTH) and the B-chain of oxidized insulin were shown to be susceptible to hydrolysis by Hageman factor. On account of the amino acid sequence of some isolated peptides it was concluded that the proteolytic activity of Hageman factor splits arginyl- and lysylbonds.

The analytical experiments described in Chapter VI demonstrate that Hageman factor is a sialoglycoprotein. The data indicate that Hageman factor contains galactose (3.6%), mannose (1.8%), galactosamine (1.6%), glucosamine (3.2%), sialic acid (4.4%) and fucose (0.4%). The ratio of galactose, mannose, hexosamine, sialic acid is 4:2:6:3, which suggests

the presence of heterosaccharide units of simple molecular composition in HF. A terminal position of the sialic acid group is concluded from its complete liberation by mild acid hydrolysis and by *Vibrio cholerae* neuraminidase. Removal of sialic acid affected neither esterase nor clotting activities, nor did it decrease the stability of the enzyme. In contrast, the sensitivity of HF towards lima bean trypsin inhibitor increased by about 40% upon removal of these polar sialic acid residues.

In Chapter VII results of sedimentation and diffusion experiments are described. The Hageman factor molecule had a sedimentation constant $s^{0}_{20,w} = 7.08$ S and a diffusion constant $D^{0}_{20,w} = 7.1 \times 10^{-7}$ cm²/sec. From these physical constants a molecular weight of 82,000 was derived, in good agreement with the value of 80,000 estimated by means of ionizing radiation. Sephadex gel filtration on G 200 suggested a molecular weight of close to 160,000.

In the concluding chapter the effects of our purified HF preparation on clotting and fibrinolysis are described. In the presence of glass or kaolin shorter clotting times were obtained with purified HF than if the experiments were carried out in plastic tubes. In terms of the clotting mechanism this means that the isolated HF occurs in an inactive form, but may be activated by glass or kaolin. This "contact activation" however does not involve a structural change of the Hageman factor of such an extent that a larger enzymatic activity results. The phenomenon of contact activation can be simulated completely with isolated HF in the absence of enzyme activation. Possibly contact activation is a catalytic acceleration of the enzymatic reaction between HF and PTA by preferential adsorption of both at a suitable surface.

Besides its capacity to activate PTA, HF appears to possess plasminogen activator activity. Both reactions are inhibited by DFP. The activation of PTA does not follow zero order kinetics in the presence of a contact surface. The quantity of contact product formed under these circumstances depends on the amount of added HF. Our own observations and data in the literature support the assumption that HF in the adsorbed state probably activates PTA by a proteolytic process. The resulting product, activated PTA, shows a great affinity either for the HF enzyme surface or the contact surface at which the enzyme is adsorbed. This affinity would result in a binding of activated PTA, preventing the HF enzyme from further activating PTA.

LITERATUURLIJST

1. J.LISTER, Proc.Roy.Soc. 12 (1863) 580
2. J.BORDET en O.GENGOU, Ann.Inst.Pasteur 17 (1903) 822
3. P.NOLF, Medicine 17 (1938) 381
4. E.L.LOZNER en F.H.TAYLOR, J.Clin.Invest. 21 (1942) 241
5. C.L.CONLEY, R.C.HARTMANN en W.I.MORSE, J.Clin.Invest. 28 (1949) 340
6. O.D.RATNOFF en C.L.CONLEY, Bull. Johns Hopkins Hosp. 89 (1951) 245
7. A.J.QUICK en E.EPSTEIN, J.Appl.Physiol. 4 (1952) 840
8. E.SHAFRIR en A.DE VRIES, J.Clin.Invest. 35 (1956) 1183
9. O.D.RATNOFF, J.Lab.Clin.Med. 44 (1954) 915
10. O.D.RATNOFF en J.E.COLOPY, J.Clin.Invest. 34 (1955) 602
11. O.D.RATNOFF en A.G.STEINBERG, J.Lab.Clin.Med. 59 (1962) 980
12. C.HAANEN, H.B.BENRAAD en G.MORSELT, Ned. Tijdschr. Geneesk. 104 (1960) 1472
13. C.HAANEN, F.HOMMES, H.BENRAAD en G.MORSELT, Thromb. Diath. Haemorrhag. 5 (1960) 201
14. P.MORAWITZ, Ergebn. Physiol. 4 (1905) 307
15. P.A.OWREN, Acta Med. Scand. (1947) suppl. 194
16. R.BIGGS en R.G.MACFARLANE, "Human Blood Coagulation and its Disorders" 3e Editie (1962), Blackwell Scientific Publications, Oxford
17. C.HOUGIE, "Fundamentals of blood coagulation in Clinical Medicine" (1963) McGraw - Hill Book Co. Inc. New York
18. K.LAKI en L.LORAND, Science 108 (1948) 280
19. A.G.LOEWEY, K.DUNATHAN, R.KRIEL en H.L.WOLFINGER, J.Biol.Chem. 236 (1961) 2625, 2634
20. A.G.LOEWEY, J.E.DAHLBERG, W.V.DORWART, M.J.WEBER en J.EISELE, Biochem. Biophys. Res. Commun. 15 (1964) 177
21. N.CHANDRASEKHAR, A.OSBAHR en K.LAKI, Biochem.Biophys.Res. Commun. 15 (1964) 182
22. H.A.SCHERAGA, Molecular Biology Vol.I "Protein Structure" (1961) Academic Press, New York
23. J.G.G.SCHOENMAKERS, In Symposium "Bloedstolling" Nijmegen (1964) 93
24. Y.NEMERSON en T.H.SPAET, Blood 23 (1964) 657
25. D.PAPAHADJOPOULOS en D.J.HANAHAN, Biochim.Biophys. Acta 90 (1964) 436
26. D.PAPAHADJOPOULOS, C.HOUGIE en D.J.HANAHAN, Biochemistry 3 (1964) 264
27. R.T.BRECKENRIDGE en O.D.RATNOFF, In "Genetics and the Interaction of Blood Clotting Factors", pag.217 (1965) F.K.Schattauer, Stuttgart
28. M.P.ESNOUF en F.JOBIN, In "Genetics and the Interaction of Blood Clotting Factors" pag. 103 (1965) F.K.Schattauer, Stuttgart
29. M.P.ESNOUF en W.J.WILLIAMS, Thromb. Diath. Haemorrhag. 7 (1962) Suppl. 1, 213
30. R.G.MACFARLANE, Thromb. Diath. Haemorrhag. 7 (1962) Suppl. 1, 222
31. J.H.MILSTONE, Federation Proc. 23 (1964) 742
32. E.MARCINIAK en W.H.SEEGERS, Can.J.Biochem.Physiol. 40 (1962) 597
33. O.D.RATNOFF en J.M.ROSENBLUM, Am.J.Med. 25 (1958) 160
34. O.D.RATNOFF, E.W.DAVIE en D.L.MALLETT, J.Clin.Invest. 40 (1961) 803
35. O.D.RATNOFF en E.W.DAVIE, Biochemistry 1 (1962) 967

36. J.MARGOLIS, J.Physiol. 144 (1958) 1
37. J.MARGOLIS, Ann. NY Acad. Sci. 104 (1963) 133
38. B.A.WAALER, Scand. J.Clin. Lab. Invest. 11 (1959) Suppl. 37,1
39. C.L.JOHNSTON, J.H.FERGUSON en F.A.O'HANLON, Proc.Soc. Exptl.Biol. Med. 99 (1958) 197
40. J.P.SOULIER, O.WARTELLE en D.MÉNACHÉ, Brit. J.Haematol. 5 (1959) 121
41. R.M.HARDISTY en J.MARGOLIS, Brit. J.Haematol. 5 (1959) 203
42. S.SCHIFFMAN, S.I.RAPAPORT en M.J.PATCH, Blood 22 (1963) 733
43. O.D.RATNOFF en E.W.DAVIE, Biochemistry 1 (1962) 677
44. H.S.KINGDON, E.W.DAVIE en O.D.RATNOFF, Biochemistry 3 (1964) 166
45. R.L.LUNDBLAD en E.W.DAVIE, Biochemistry 3 (1964) 1720
46. R.BIGGS en R.G.MACFARLANE, In "Genetics and the Interaction of Blood Clotting Factors" pag.23 (1965). F.K.Schattauer, Stuttgart
47. R.G.MACFARLANE, R.BIGGS, B.J.ASH en K.W.DENSON, Brit.J.Haematol. 10 (1964) 530
48. A.J.HELLEM en P.A.OWREN, Acta Haematol. 31 (1964) 230
49. E.F.LÜSCHER, Vox Sanguinis 1 (1956) 133
50. Y.BOUNAMEAUX, Compt. Rend. Soc. Biol. 153 (1959) 865
51. E.W.DAVIE en O.D.RATNOFF, Science 145 (1964) 1310
52. R.G.MACFARLANE, Nature 202 (1964) 498
53. S.SHERRY en W.TROLL, J.Biol.Chem. 208 (1954) 95
54. J.H.MILSTONE, N.OULIANOFF en V.K.MILSTONE, J.Gen. Physiol. 47 (1963) 315
55. J.H.MILSTONE en V.K.MILSTONE, Proc.Soc.Exptl. Biol. Med. 117 (1964) 290
56. W.H.SEEGERS, E.R.COLE, C.R.HARMISON en E.MARCINIAK, Can.J.Biochem. Physiol. 41 (1963) 1047
57. T.H.SPAET, Federation Proc. 23 (1964) 757
58. H.LAMPERT, "Die Physikalische Seite des Blutgerinnungsproblems und ihre praktische Bedeutung" (1931) G.Thieme, Leipzig
59. J.S.HIRSCHBOECK, Proc.Soc.Exptl. Biol. Med. 45 (1940) 122
60. D.HUBBARD en G.L.LUCAS, J.Appl.Physiol. 15 (1960) 265
61. R.BIGGS, A.A.SHARP, J.MARGOLIS, R.M.HARDISTY, J.STEWART en W.M.DAVIDSON, Brit. J.Haematol. 4 (1958) 177
62. L.VROMAN, Dissertatie, Utrecht (1958)
63. J.MARGOLIS, Nature 178 (1956) 805
64. J.MARGOLIS, Proc.XIIIth Internat. Congress Haematol. (1960) 1820
65. C.HAANEN, F.HOMMES en G.MORSELT, Thromb. Diath. Haemorrhag. 6 (1961) 261
66. J.MARGOLIS, Australian J.Exptl.Biol,Med,Sci. 39 (1961) 249
67. J.P.SOULIER en O.PROU-WARTELLE, Brit.J.Haematol. 6 (1960) 88
68. P.DIDISHEIM, Federation Proc. 18 (1959) 474
69. R.W.KELLERMEYER en R.T.BRECKENRIDGE, J.Lab.Clin.Med. 65 (1965) 307
70. J.MARGOLIS, Australian J.Exptl.Biol,Med,Sci. 40 (1962) 505
71. W.E.CONNOR, J.Clin.Invest. 41 (1962) 1199
72. P.DIDISHEIM en R.S.MIBASHAN, Thromb. Diath. Haemorrhag. 9 (1963) 346
73. H.L.NOSSEL, "The Contact Phase of Blood Coagulation", Blackwell Scientific Publ., Oxford (1964)
74. S.SCHIFFMAN, S.I.RAPAPORT, A.G.WARE en J.W.MEHL, Proc.Soc.Exptl. Biol. Med. 105 (1960) 453
75. O.D.RATNOFF en J.D.CRUM, J.Lab.Clin.Med. 63 (1964) 359

76. M.E.WEBSTER en O.D.RATNOFF, *Nature* 192 (1961) 180
77. L.VROMAN, *Thromb. Diath. Haemorrhag.* 10 (1964) 455
78. L.VROMAN, *Thromb. Diath. Haemorrhag.* 13 (1965) 387
79. J.MARGOLIS, *J.Physiol.* 137 (1957) 95
80. E.L.BECKER, *J.Lab.Clin. Med.* 56 (1960) 136
81. O.D.RATNOFF en A.A.MILES, *Brit.J.Exptl.Pathol.* 45 (1964) 328
82. S.NIEWIAROWSKI, J.STACHURSKA en Z.WEGRZYNOWICZ, *Thromb.Diath. Haemorrhag.* 7 (1962) 514
83. V.EISEN, *Brit.Med.Bull.* 20 (1964) 205
84. H.KRAUT, E.K.FREY en E.WERLE, *Hoppe-Seylers Z.Physiol.Chem.* 189 (1930) 97
85. E.WERLE en I.TRAUTSCHOLD, *Ann. NY Acad.Sci.* 104 (1963) 117
86. H.MORIYA, J.V.PIERCE en M.E.WEBSTER, *Ann. NY Acad.Sci.* 104 (1963) 172
87. D.ARMSTRONG, J.B.JEPSON, C.A.KEELE en J.W.STEWART, *J.Physiol.* 135 (1957) 350
88. J.MARGOLIS, *J.Physiol.* 151 (1960) 238
89. B.MASON en A.A.MILES, *Nature* 196 (1962) 587
90. P.J.MILL, J.M.ELDER, A.A.MILES en D.L.WILHELM, *Brit. J.Exptl. Pathol.* 39 (1958) 343
91. G.E.DAVIES en J.S.LOWE, *Brit. J.Pharmacol.* 21 (1963) 491
92. M.ROCHA E SILVA, *Ann. NY Acad. Sci.* 104 (1963) 190
93. W.VOGT, *J.Physiol.* 170 (1964) 153
94. S.NIEWIAROWSKI en O.PROU-WARTELLE, *Thromb. Diath. Haemorrhag.* 3 (1959) 593
95. S.G.IATRIDIS en J.H.FERGUSON, *J.Clin.Invest.* 41 (1962) 1277
96. O.D.RATNOFF, *J.Clin.Invest.* 37 (1958) 923
97. H.L.NOSSEL en J.NIEMETZ, *Clin. Res.* 12 (1964) 228
98. C.HAANEN en J.G.G.SCHOENMAKERS, *Thromb.Diath.Haemorrhag.* 9 (1963) 557
99. J.MARGOLIS, *J.Clin.Path.* 11 (1958) 406
100. S.I.RAPAPORT, S.SCHIFFMAN, M.J.PATCH en A.G.WARE, *J.Lab.Clin.Med.* 57 (1961) 771
101. P.A.OWREN, *Acta Med. Scand.* (1947) suppl. 194
102. J.SCHOENMAKERS, R.MATZE, C.HAANEN en F.ZILLIKEN, *Biochim.Biophys. Acta* 93 (1964) 433
103. G.W.SCHWERT en Y.TAKENAKA, *Biochim. Biophys. Acta* 16 (1955) 570
104. O.H.LOWRY, N.J.ROSEBROUGH, A.L.FARR en R.J.RANDALL, *J.Biol.Chem.* 193 (1951) 265
105. E.T.YIN en F.DUCKERT, *Thromb. Diath. Haemorrhag.* 6 (1961) 215
106. P.DIDISHEIM, *Federation Proc.* 20 (1961) 61
107. E.A.PETERSON en H.A.SOBER, In "The Plasma Proteins" Ed. F.W.Putnam, Vol I pag.105 (1960) Acad. Press, New York
108. J.PORATH, *Advan. Protein Chemistry* 17 (1962) 209
109. P.FLODIN, *Dissertatie, Uppsala*, 1962
110. R.J.PLANTA, *Chem. Weekblad* 59 (1963) 357
111. E.J.COHN, L.E.STRONG, W.L.HUGHES, D.J.MULFORD, J.N.ASHWORTH, M.MELIN en H.L.TAYLOR, *J.Am.Chem.Soc.* 68 (1946) 459
112. E.J.COHN, F.GURD, D.M.SURGENOR, B.A.BARNES, R.K.BROWN, G.DEROUAUX, J.M.GILLESPIE, F.W.KAHNT, W.F.LEVER, C.H.LIU, D.MITTELMAN, R.F.MOUTON, K.SCHMID en E.UROMA, *J.Am.Chem. Soc.* 72 (1950) 465

113. L.ORNSTEIN en B.J.DAVIES, "Disc Electrophoresis", Distillation Products Ind., Eastman Kodak Co., Rochester, 1962
114. R.A.REISFELD, U.J.LEWIS en D.E.WILLIAMS, *Nature* 195 (1962) 281
115. J.PORATH, *Biochim. Biophys. Acta* 22 (1956) 151
116. B.GELOTTE, P.FLODIN en J.KILLANDER, *Arch. Biochem. Biophys. suppl.* 1 (1962) 319
117. M.SMITH, D.H.RAMMLER, I.H.GOLDBERG en H.G.KHORANA, *J.Am.Chem. Soc.* 84 (1962) 430
118. C.W.PARR, *Biochem. J.Prod. Biochem. Soc.* 324th meeting, XXVII (1953)
119. J.G.G.SCHOENMAKERS, R.M.KURSTJENS, C.HAANEN en F.ZILLIKEN, *Thromb. Diath. Haemorrhag.* 9 (1963) 546
120. E.F.JANSEN en A.K.BALLS, *J.Biol.Chem.* 194 (1952) 721
121. D.E.KOSHLAND Jr., *Science* 142 (1963) 1533
122. R.A.OOSTERBAAN, *Chem.Weekblad* 58 (1962) 453
123. M.L.BENDER, 14e Coll. der Gesellschaft für *Physiol.Chemie*, Mosbach pag. 47. Springer Verlag, Berlin (1964)
124. B.S.HARTLEY en B.A.KILBY, *Biochem. J.* 50 (1952) 672; 56 (1954) 288
125. H.GUTFREUND en J.M.STURTEVANT, *Biochem. J.* 63 (1956) 656
126. M.L.BENDER en E.T.KAISER, *J.Am.Chem.Soc.* 84 (1962) 2556
127. G.SCHOELLMAN en E.SHAW, *Biochemistry* 2 (1963) 252
128. S.HESTIN, *J.Biol.Chem.* 180 (1949) 249
129. P.S.ROBERTS, *J.Biol.Chem.* 232 (1958) 285
130. M.E.BROWN, *J.Lab. Clin. Med.* 55 (1960) 616
131. C.F.JACOBSEN, J.LÉONIS, K.LINDERSTRØM-LANG en M.OTTESEN, *Methods Biochem. Anal.* 4 (1957) 171
132. I.TRAUTSCHOLD en E.WERLE, *Hoppe-Seylers Z.Physiol.Chem.* 325 (1961) 48
133. E.RONWIN, *Can.J.Biochem.Physiol.* 38 (1960) 57
134. M.RYBÁK, M.KRONBAUER en M.PETÁKOVÁ, *Collection Czech. Chem. Commun.* 28 (1963) 733
135. G.G.GUILTBAULT en D.N.KRAMER, *Anal. Chem.* 36 (1964) 409
136. A.M.SIEGELMAN, A.S.CARLSON en T.ROBERTSON, *Arch.Biochem.Biophys.* 97 (1962) 159
137. K.HEIDE en H.HAUPT, *Behringwerk-Mitteilungen* 43 (1964) 161
138. R.E.BOTTI en O.D.RATNOFF, *J.Clin.Invest.* 42 (1963) 1569
139. E.F.CURRAGH en D.T.ELMORE, *Biochem. J.* 93 (1964) 163
140. N.J.BAINES, J.B.BAIRD en D.T.ELMORE, *Biochem. J.* 90 (1964) 470
141. H.LINEWEAVER en D.BURK, *J.Am.Chem.Soc.* 56 (1934) 658
142. P.DESNUELLE, In "The Enzymes" 2e editie, Vol IV, pag.119 (1959), Acad. Press, New York
143. M.MATSUBARA, B.HAGIHARA, M.NAKAI, T.KOMAKI, T.YONETANI en K.OKUNUKI, *J.Biochem.* 45 (1958) 251
144. B.BLOMBÄCK en M.BLOMBÄCK, *Nature* 198 (1963) 886
145. M.M.GREEN, J.A.GLADNER, L.W.CUNNINGHAM en H.NEURATH, *J.Am. Chem. Soc.* 74 (1952) 2122
146. H.A.SCHERAGA, *Ann. NY Acad. Sci.* 75 (1958) 189
147. E.L.SMITH en J.R.KIMMEL, In "The Enzymes" 2e editie, Vol IV, pag.133 (1960) Academic Press, New York
148. F.B.ABLONDI en J.J.HAGEN, In "The Enzymes" 2e editie, Vol IV, pag.175 (1960) Academic Press, New York

149. N.ALKJAERSIG, A.P.FLETCHER en S.SHERRY, J.Biol.Chem. 234 (1959) 832
150. F.B.ABLONDI, J.J.HAGAN, M.PHILIPS en E.C.DE RENZO, Arch.Biochem. Biophys. 82 (1959) 153
151. H.KRAUT, E.K.FREY en E.WERLE, Hoppe-Seylers Z.Physiol.Chem. 192 (1930) 1
152. H.KRAUT en N.BHARGAVA, Hoppe-Seylers Z.Physiol.Chem. 334 (1963) 236
153. R.MARX, P.CLEMENTE, E.WERLE en W.APPEL, Blut 5 (1959) 367; 9 (1963) 164
154. D.A.ARMSTRONG en G.L.MILLS, Biochem.Pharmacol. 13 (1964) 1393
155. M.DIXON en E.C.WEBB, In "Enzymes" 2e editie, pag.327 (1964), Longmans, Green and Co., London
156. W.F.HARRINGTON en J.A.SCHELLMAN, Compt.Rend. trav. Lab. Carlsberg 30 (1957) no.12
157. A.RIEDEL, E.WÜNSCH en A.HARTL, Hoppe-Seylers Z.Physiol.Chem. 316 (1959) 61
158. B.F.ERLANGER, N.KOKOWSKY en W.COHEN, Arch. Biochem. Biophys. 95 (1961) 271
159. J.L.BAILEY. "Techniques in Protein Chemistry" (1962) Elsevier Publ.Co., Amsterdam
160. V.M.INGRAM, Methods in Enzymol. 6 (1963) 834
161. F.SANGER en H.TUPPY, Biochem. J. 49 (1951) 481
162. M.BRENNER, A.NIEDERWIESER en G.PATAKI, Experientia 17 (1961) 145
163. G.BISERTE en R.OSTEUX, Bull.Soc.Chim.Biol. 33 (1951) 50
164. G.BLIX, A.GOTTSCHALK en E.KLENK, Nature 179 (1957) 1088
165. F.ZILLIKEN en W.M.WHITEHOUSE, Advan. Carbohydrate Chem. 13 (1958) 237
166. R.J.WINZLER, In "The Plasma Proteins" F.W.Putnam Ed., Vol I, pag.309 (1960) Academic Press, New York
167. H.E.SCHULTZE, Bull.Schweiz.Akad. Med. Wissensch. 17 (1961) 77
168. G.ASHWELL, Ann. Rev. Biochem. 33 (1964) 101
169. R.G.SPIRO, New Engl. J. Med. 269 (1963) 616
170. E.H.EYLAR en R.W.JEANLOZ., J.Biol.Chem. 237 (1962) 622, 1021
171. R.BOURRILLON, R.GOT en D.MEYER, Biochim. Biophys. Acta 74 (1963) 255
172. S.A.BARKER, G.I.PARDOE, M.STACEY en J.W.HOPTON, Nature 197 (1963) 231
173. J.W.ROSEVAER en E.L.SMITH, J.Biol.Chem. 236 (1961) 425
174. C.NOLAN en E.L.SMITH, J.Biol. Chem. 237 (1962) 446, 453
175. Y.C.LEE en R.MONTGOMERY, Arch. Biochem. Biophys. 97 (1962) 9
176. R.G.SPIRO, J.Biol. Chem. 239 (1964) 567
177. E.R.GRAHAM, W.H.MURPHY en A.GOTTSCHALK, Biochim. Biophys. Acta 74 (1963) 222
178. D.H.NORTHCOTE, Ann.Rev. Biochem. 33 (1964) 51
179. L.MESTER, E.MOCZAR, G.MEDGYESI en K.LAKI, Compt. Rend. Acad.Sci. 256 (1963) 307, 3210
180. G.A.JAMIESON, Biochem. Biophys. Res. Commun. 17 (1964) 775
181. A.GOTTSCHALK en M.A.W.THOMAS, Biochim. Biophys. Acta 46 (1961) 91
182. G.K.HIRST, J.Exptl. Med. 76 (1942) 195
183. A.GOTTSCHALK en P.E.LIND, Nature 164 (1949) 232

184. E.KLENK, H.FAILLARD en H.LEMPFRID, Hoppe-Seylers Z.Physiol. Chem. 301 (1955) 235
185. H.FAILLARD, W.PRIBILLA en H.E.POSTH, Int. Z. Vit.forsch. 31 (1961) 377
186. A.GOTTSCHALK, W.K.WHITTEN en E.R.GRAHAM, Biochim. Biophys. Acta 38 (1960) 183
187. P.H.LOWY, G.KEIGHLEY en H.BORSOOK, Nature 185 (1960) 102
188. L.LORAND, N.ALKJAERSIG en W.H.SEEGERS, Arch. Biochem. Biophys. 45 (1953) 312
189. G.SCHWICK en H.E.SCHULTZE, Clin.Chim. Acta 4 (1959) 26
190. I.M.NILSSON en I.YAMASHINA, Nature 181 (1958) 711
191. N.CHANDRASEKHAR, L.WARREN, A.J.OSBAHR en K.LAKI, Biochim.Biophys. Acta 63 (1962) 337
192. K.LAKI en N.CHANDRASEKHAR, Nature 197 (1963) 1267
193. M.SCHÖNENBERGER, H.KELLNER, H.SÜDHOF en H.HAUPT, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 309 (1957) 145
194. H.E.SCHULTZE, R.SCHMIDTBERGER en H.HAUPT, Biochem. Z. 329 (1958) 490
195. N.F.BOAS, J.Biol. Chem. 204 (1953) 553
196. C.RIMINGTON, Biochem. J. 34 (1940) 931
197. L.WARREN, J.Biol. Chem. 234 (1959) 1971
198. P.A.ANASTASSIADIS en R.H.COMMON, Can. J.Biochem. Physiol. 36 (1958) 413
199. C.M.WILSON, Anal. Chem. 31 (1959) 1199
200. F.G.FISCHER en H.DÖRFEL, Hoppe-Seylers Z.Physiol. Chem. 297 (1954) 164
201. E.F.HARTREE, Anal. Biochem. 7 (1964) 103
202. R.G.SPIRO en M.J.SPIRO, Federation Proc. 22 (1963) 177
203. O.SVENSMARK en E.HEILBRONN, Biochim. Biophys. Acta 92 (1964) 400
204. J.G.G.SCHOENMAKERS, R.MATZE, C.HAANEN en F.ZILLIKEN, Biochim. Biophys. Acta 101 (1965) 166
205. H.G.ELIAS, "Ultrazentrifugen-Methoden" (1961) 2e Editie, Beckman Instruments GmbH., München
206. R.A.PHELPS en F.W.PUTNAM, "The Plasma Proteins", F.W.PUTNAM Ed., Vol I, pag. 158 (1960), Academic Press, New York
207. C.HAANEN, G.MORSELT, J.SCHOENMAKERS, M.MATERS en R.BRAAMS, Scand. J. Haematol. 2 (1965) 248
208. L.G.AUGENSTINE, Advan.Enzymol. 24 (1962) 359
209. R.BRAAMS, Atoomenergie en haar toepassingen 4 (1962) 47
210. D.E.LEA, "Actions of Radiations on Living Cells" (1946), Cambridge University Press, London
211. E.C.POLLARD, W.GUILD, F.HUTCHINSON en R.B.SETLOW, Progr.Biophys. and Biophys. Chem. 5 (1955) 72
212. J.W.PREISS en A.G.McNISH, Rad. Res. 14 (1961) 337
213. P.ANDREWS, Biochem. J. 91 (1964) 222
214. T.WIELAND, P.DUESBERG en H.DETERMANN, Biochem. Z. 337 (1963) 303
215. F.AURICCHIO en C.B.BRUNI, Biochem. Z. 340 (1964) 321
216. J.R.WHITAKER, Anal. Chem. 35 (1963) 1950
217. C.HAANEN, J.G.G.SCHOENMAKERS en G.E.MORSELT, Xth.Congress Internat. Soc. Haematol., Stockholm G 53 (1964)
218. C.HAANEN, G.E.MORSELT en J.G.G.SCHOENMAKERS, J.Lab.Clin.Med. (in druk)

219. C.DUDOK DE WIT, H.W.KRIJNEN en G.J.H.DEN OTTOLANDER, *Thromb. Diath. Haemorrhag.* 8 (1962) 315
220. T.ASTRUP en S.MÜLLERTZ, *Arch. Biochem. Biophys.* 40 (1952) 346
221. A.GOTTSCHALK, In "The Enzymes" 2e editie, Vol IV, pag.461 (1960), Academic Press, New York
222. S.YACHNIN en F.H.GARDNER, *Brit.J.Haematol.* 7 (1961) 465
223. M.E.RAFELSON, L.CLOAREC, J.MORETTI en M.F.JAYLE, *Nature* 191 (1961) 279

STELLINGEN

I

Het versnellende effect van glasoppervlakken op de stolling mag niet louter beschouwd worden als een contact activering van de Hageman factor, maar evenzeer als een katalytisch versnellen van de reactie van de Hageman factor met het plasma tromboplastine antecedent (PTA).

O.D.Ratnoff en J.M.Rosenblum, Am.J.Med.25 (1958) 160

O.D.Ratnoff, E.W.Davie en D.L.Mallett, J.Clin.Invest.40 (1961)
803

J.Margolis, Ann.NY Acad.Sci.104 (1963) 133

Dit proefschrift

II

De bindingsconstanten van metaal-gelatine complexen, verkregen door Malik en Muzaffaruddin, zijn gebaseerd op een aanvechtbare interpretatie van de experimentele gegevens.

W.U.Malik en M.Muzaffaruddin, Experientia 21 (1965) 232

III

Om de moleculen in het biologische object welke primair bij de inductie van een effect door een farmacon betrokken zijn, chemisch te karakteriseren, moet aan de methode toegepast door Dikstein en Sulman, grote waarde worden toegekend.

S.Dikstein en F.G.Sulman, Biochem.Pharmacol.14 (1965) 881

IV

De patroonvorming van precipitaatlijnen bij immuno-elektroforese van stijlen en pollen van *Petunia* klonen, na homologe en heterologe combinaties, behoeft niet op immunologische antigen - antilichaam relaties te berusten.

H.F.Linskens, *Dodonea* 33 (1965) 35

V

De activerende werking op kallikreïnegeen, welke door Davies en Lowe aan het uit caviaserum geïsoleerde preparaat wordt toegekend, berust waarschijnlijk op een verontreiniging van de Hageman factor.

G.E.Davies en J.S.Lowe, *Brit.J.Pharmacol.*21 (1963) 491

Eigen waarnemingen

VI

De methode ter bepaling van het moleculairgewicht met behulp van gel-filtratie over Sephadex is voor glycoproteïnen van geringe waarde.

T.Wieland, P.Duesberg en H.Determann, *Biochem.Z.*337 (1963) 303

J.R.Whitaker, *Anal.Chem.*35 (1963) 1950

P.Andrews, *Biochem.J.*91 (1964) 222

VII

De waarde van het vergelijkend onderzoek van Glässer en Kleine over twee gevoelige methoden voor de eiwitbepaling is twijfelachtig, daar als omrekeningsfactor bij de Kjeldal-N-bepaling voor alle onderzochte eiwitten dezelfde waarde is toegepast.

D.Glässer en R.Kleine, *Pharmazie* 17 (1962) 32

VIII

Het op gang brengen van de intrinsieke stolling door de Hageman factor is waarschijnlijk een proteolytisch proces.

Dit proefschrift

IX

De opvatting van Hele, dat s-RNA een allosterische regulator is voor de leucine en isoleucine afhankelijke ATP-PP, exchange reacties, is in haar allosterisch karakter niet bewezen.

P.Hele, Biochim.Biophys.Acta 87 (1964) 449

X

De argumenten, welke Bignardi c.s. doen besluiten het peptide uit de glandula submaxillaris van honden als een sulfosialo-polysaccharide-peptide te karakteriseren, zijn onvoldoende.

C.Bignardi, G.Aureli, C.Balduini, A.A.Castellani, Biochem.Biophys,Res.Commun.17 (1964) 310

XI

Bij het vervoer van gewonden tengevolge van verkeersongevallen dient ijlvervoer achterwege gelaten te worden.

